



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ  
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

**CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**INFORME DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AMBIENTAL**

**MECANISMO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

**EVALUACIÓN DE *Bacillus sp.* ANTÁRTICOS EN LA  
BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO PET**

**AUTORAS:**

**ÁLAVA CEVALLOS SÁLLURY GEMA  
VELÁSQUEZ CATAGUA CLARIBEL ACCIDALIA**

**TUTORA:**

**BLGA. MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS, MG.**

**CALCETA, FEBRERO DE 2023**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotras, **SÁLLURY GEMA ÁLAVA CEVALLOS**, con cédula de ciudadanía **1313707554** y **CLARIBEL ACCIDALIA VELÁSQUEZ CATAGUA**, con cédula de ciudadanía **1313070128**, declaramos bajo juramento que el Trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de *Bacillus sp.* antárticos en la biodegradación de polietileno PET**” es de nuestra autoría, que no ha sido preliminarmente presentado para ningún grado o calificación profesional, y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, otorgamos en beneficio de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos. De la misma manera, preservando a nuestro favor todos los derechos patrimoniales de autoría referente a este trabajo de titulación, tal como lo establece el art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación (COESC+i).



---

**SÁLLURY GEMA  
ÁLAVA CEVALLOS**

**C.C.: 1313707554**



---

**CLARIBEL ACCIDALIA  
VELÁSQUEZ CATAGUA**

**C.C.: 1313070128**

## AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotras, **SÁLLURY GEMA ÁLAVA CEVALLOS**, con cédula de ciudadanía **1313707554** y **CLARIBEL ACCIDALIA VELÁSQUEZ CATAGUA**, con cédula de ciudadanía **1313070128**, autorizamos a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, la publicación en la biblioteca de la institución del Trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de *Bacillus sp.* antárticos en la biodegradación de polietileno PET**”, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra exclusiva responsabilidad y total autoría.



---

**SÁLLURY GEMA  
ÁLAVA CEVALLOS**

**C.C.: 1313707554**



---

**CLARIBEL ACCIDALIA  
VELÁSQUEZ CATAGUA**

**C.C.: 1313070128**

## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

**MARÍA FERNANDA PINCAY CANTOS**, certifica haber tutelado el Trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de *Bacillus sp.* antárticos en la biodegradación de polietileno PET**”, que ha sido desarrollado por **SÁLLURY GEMA ÁLAVA CEVALLOS** y **CLARIBEL ACCIDALIA VELÁSQUEZ CATAGUA**, previo a la obtención del título de **INGENIERA AMBIENTAL**, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

Blga. María Fernanda Pincay Cantos, Mg.

**TUTORA**

**C.C.: 0921757282**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

Los suscritos integrantes del Tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el Trabajo de Integración Curricular titulado: “**Evaluación de *Bacillus sp.* antárticos en la biodegradación de polietileno PET**”, que ha sido desarrollado por **SÁLLURY GEMA ÁLAVA CEVALLOS** y **CLARIBEL ACCIDALIA VELÁSQUEZ CATAGUA**, previo a la obtención del título de **INGENIERO/A AMBIENTAL**, de acuerdo al **REGLAMENTO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR DE CARRERAS DE GRADO** de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

---

Mg. Fabricio Enrique Alcívar Intriago  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**  
**C.C.: 1308632262**

---

Dr. Ever Darío Morales Avendaño  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**  
**C.C.: 0959966342**

---

Mg. Marcos Javier Vera Vera  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**  
**C.C.: 1313674481**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por cada una de sus bendiciones y amor eterno. La grandeza de su bondad es infinita, pues me ha sabido llenar de fortaleza, entereza y sabiduría, siempre con el propósito de aprender de mis faltas y mejorar como ser humano.

A mis padres y hermano, por la comprensión, paciencia y apoyo incondicional dedicado, en todas y cada una de las etapas de mi vida.

A nuestra querida Blga. María Fernanda Pincay Cantos, por su aprecio, destinar tiempo en las revisiones y demás, orientarnos correctamente y gestionar los permisos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

Al Q.F. Patricio Noles (+), Dr. José (Pepito) Ormaza, Ing. Fabián Peñarrieta, Ing. Jonathan Chicaiza, Ing. Piero Fajardo, Lic. Katty Ormaza e Ing. Diego Zambrano, por la consideración y afecto demostrado, sugerencias, y ayuda sincera manifestada en este proceso.

A mi amiga y colega, Claribel Velásquez, por su estimación, optimismo y consejos en este trayecto. De la misma manera, por su visión, compromiso, dedicación y esfuerzo para la culminación de nuestro trabajo.

A mis amigos, por permanecer conmigo en los buenos y malos momentos, mediante la amistad verdadera.

A mis distinguidos docentes y apreciada Ing. Valeria Fernández (asistente de carrera), por compartir sus conocimientos y experiencias durante esta travesía. Les agradezco por haber sido ese soporte y permitirme contar con una amistad valiosa e incomparable, siempre me sentiré honrada en poseerla.

A la ESPAM MFL, por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios hacia la educación superior. En esta, desarrollé mis destrezas y adquirí distintos conocimientos.

**SÁLLURY GEMA ÁLAVA CEVALLOS**

## **AGRADECIMIENTO**

A lo largo de mi vida he entendido que la gratitud convierte aquellos problemas en bendiciones y a lo inesperado en regalos, guiándonos a grandes cosas. Al término de una etapa más, quiero en primer lugar agradecer a Dios por la fortaleza que me ha brindado, por guiarme en todo momento permitiendo no rendirme en el camino, a caer y levantarme con fuerza para ir en busca de mis más grandes sueños.

A mis padres que sin duda alguna han sido ese pilar fundamental por los cuales me esfuerzo día con día, para devolverles mucho de lo que ellos me han dado. Gracias a su apoyo incondicional, a sus palabras de aliento que me incentivan a trabajar por mis objetivos académicos y personales.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día.

A nuestra tutora Blga. María Fernanda Pincay Cantos que con dedicación, paciencia y amor a la docencia nos ha brindado e impartido su conocimiento, haciendo posible el desarrollo del presente trabajo de investigación. Gracias por sus consejos y su guía, siempre estarán presentes en mi mente.

A todos aquellos docentes que hicieron parte de mi formación académica en el transcurso de estos cinco años, infinitas gracias por su sabiduría, tiempo y dedicación.

**CLARIBEL ACCIDALIA VELÁSQUEZ CATAGUA**

## DEDICATORIA

A mi madre: Lic. Consuelo Cevallos Pinargote, por su inmenso amor, comprensión, paciencia y sacrificio desde siempre. Por estar ahí, alentándome para seguir adelante en mi desarrollo académico y personal. También, por transmitirme esa tenacidad y valentía para alcanzar todo lo que me propongo.

A mi padre: Lic. Alexis Álava Bravo, por creer en mis capacidades, apoyarme en la toma de decisiones y contar con su cariño.

A mi hermano, Lic. Junior Álava Cevallos, por ser un gran apoyo, su presencia es única en mi vida, ya que hemos pasado por muchos acontecimientos juntos. Me enorgullece saber lo que piensa de mí y es una de mis tantas motivaciones para continuar mejorando día a día.

A los dos ángeles que me cuidan: mi abuelita, Justina Salvadora Pinargote Rendón (+), en su existencia siempre me demostró un cariño entrañable y lo mejor de sí misma. Asimismo, mi mejor amigo (de cuatro patas), Padwa (+), llegaste a mi vida para llenarla de alegría y enseñanzas que me marcaron. Ellos, son quienes siguen mis pasos en todo momento desde el firmamento.

A mis maestros de vida, perennemente se hicieron presentes como mis mentores con esas palabras y acciones tan cálidas, colmadas de amor, sabiduría y reflexión.

A mis amigos y colegas incondicionales, que me acompañaron en este camino con una amistad sincera, buenos deseos y un enfoque de autosuperación memorable.

**SÁLLURY GEMA ÁLAVA CEVALLOS**



## **DEDICATORIA**

El presente trabajo investigativo está dedicado a mi familia. Principalmente a mis padres Lucía Catagua y Rolando Velásquez que con su ejemplo de perseverancia han inspirado mis pasos para sobrellevar los obstáculos y con pie firme lograr mis metas. Ellos que me inculcaron valores y que con sus sabios consejos llenos de infinito amor han hecho de mí la persona tenaz y luchadora que hoy soy.

También quiero dedicar este trabajo a la memoria de mi papi Gusma, que sin bien no estará para aplaudir mis éxitos, estoy segura que donde quiera que este guiará mi camino a todo lo nuevo por venir, extrañándote siempre.

**CLARIBEL ACCIDALIA VELÁSQUEZ CATAGUA**

## CONTENIDO GENERAL

<b>CARÁTULA</b> .....	i
<b>DECLARACIÓN DE AUTORÍA</b> .....	ii
<b>AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN</b> .....	iii
<b>CERTIFICACIÓN DEL TUTOR</b> .....	iv
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vi
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vii
<b>DEDICATORIA</b> .....	viii
<b>DEDICATORIA</b> .....	ix
<b>CONTENIDO GENERAL</b> .....	x
<b>CONTENIDO DE TABLAS</b> .....	xiii
<b>CONTENIDO DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>CONTENIDO DE ECUACIONES</b> .....	xiv
<b>CONTENIDO DE GRÁFICOS</b> .....	xiv
<b>RESUMEN</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>CAPÍTULO I. ANTECEDENTES</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>1.4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>4</b>
1.4.1. HIPÓTESIS ALTERNATIVA .....	4

1.4.2. HIPÓTESIS NULA.....	4
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
2.1. PLÁSTICOS.....	5
2.1.1. TIPOS DE PLÁSTICOS.....	5
2.1.2. IMPACTOS DEL PLÁSTICO EN EL AMBIENTE .....	6
2.2. POLIETILENO TEREFTALATO .....	6
2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL PET .....	7
2.2.2. MÉTODOS DE DEGRADACIÓN .....	7
2.3. BIODEGRADACIÓN .....	8
2.3.1. BIOPELÍCULA .....	8
2.3.2. FASES DE BIODEGRADACIÓN DEL PLÁSTICO .....	9
2.4. BACTERIAS PSICRÓFILAS .....	9
2.5. <i>Bacillus</i> .....	10
2.5.1. ECOLOGÍA DE <i>Bacillus sp.</i> .....	11
2.5.2. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS .....	11
2.6. MEDIOS DE CULTIVO.....	11
2.7. MECANISMOS DE EVALUACIÓN.....	12
2.7.1. MICROSCOPIO ÓPTICO .....	13
2.7.2. PÉRDIDA Y PORCENTAJE DE PESO.....	13
<b>CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO .....</b>	<b>14</b>
3.1. UBICACIÓN.....	14
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	15
3.3. DURACIÓN.....	15
3.4. MÉTODOS.....	15
3.4.1. MÉTODO EXPLORATIVO.....	15
3.4.2. MÉTODO GRAVIMÉTRICO .....	15
3.4.3. MÉTODO ESTADÍSTICO .....	15

3.5. TÉCNICA .....	16
3.5.1. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	16
3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	16
3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	16
3.7.1. FASE I. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS <i>Bacillus sp.</i> PRESENTES EN MUESTRAS DE SUELO DE LA ANTÁRTIDA.....	16
3.7.1.1. ACTIVIDAD 1. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS Y TINCIÓN DE GRAM	16
3.7.2. FASE II. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE <i>Bacillus sp.</i> EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET	17
3.7.3. FASE III. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN DEL PET EN RELACIÓN A LA PÉRDIDA DE PESO Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MEJORES RESULTADOS ENCONTRADOS	21
3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	23
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
4.1. FASE I. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS <i>Bacillus sp.</i> PRESENTES EN MUESTRAS DE SUELO DE LA ANTÁRTIDA .....	25
4.2. FASE II. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE <i>Bacillus sp.</i> EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET .....	28
4.2.1. ADAPTACIÓN DE <i>Bacillus sp.</i> EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET .....	28
4.2.2. BIODEGRADACIÓN DE PET POR <i>Bacillus sp.</i> .....	29
4.3. FASE III. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN DEL PET EN RELACIÓN A LA PÉRDIDA DE PESO Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MEJORES RESULTADOS ENCONTRADOS ...	32
4.3.1. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN POR PÉRDIDA DE PESO .....	32

4.3.2. OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO ÓPTICO .....	34
4.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE BIODEGRADABILIDAD .....	35
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>37</b>
5.1. CONCLUSIONES .....	37
5.2. RECOMENDACIONES.....	37
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>52</b>
Anexo 1. Características macroscópicas y microscópicas. ....	53
Anexo 2. Registro del periodo de adaptación. ....	54
Anexo 3. Visualización microscópica de las cinco cepas de <i>Bacillus sp.</i> en el periodo de adaptación. ....	54
Anexo 4. Registro del periodo de biodegradación. ....	55
Anexo 5. Registro de pérdida de peso de las láminas PET y su variación respecto a los diferentes periodos de tiempo evaluados (15, 30 y 45 días). ....	56
Anexo 6. Porcentaje de Pérdida de Peso (%PP).....	59
Anexo 7. Observación al microscopio óptico de las láminas de PET (100X).60	
Anexo 8. Visualización de biopelícula adherida a las láminas de PET.....	60
Anexo 9. Porcentaje de Pérdida de Peso (%PP) y su transformación (%PP_TRANS). ....	61
Anexo 10. Análisis de varianza y test de Tukey en el porcentaje de Pérdida de Peso Transformado (%PP_TRANS). ....	62
Anexo 11. Procedimiento.....	63

## CONTENIDO DE TABLAS

<b>Tabla 2. 1.</b> Tipos de plásticos y usos más comunes.....	6
<b>Tabla 2. 2.</b> Propiedades físicas y químicas del PET.....	7
<b>Tabla 2. 3.</b> Taxonomía <i>Bacillus sp.</i> .....	10
<b>Tabla 2. 4.</b> Tipos de medios de cultivo.....	12

<b>Tabla 3. 1.</b> Características Climatológicas del Campus Politécnico. ....	14
<b>Tabla 3. 2.</b> Medio de sales minerales. ....	19
<b>Tabla 3. 3.</b> Cepas (tratamientos). ....	22
<b>Tabla 3. 4.</b> Formato de análisis de la varianza - Diseño de Bloques Completamente al Azar. ...	23
<b>Tabla 4. 1.</b> Identificación molecular de las <i>Bacillus sp.</i> .....	26
<b>Tabla 4. 2.</b> Características Macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas de <i>Bacillus sp.</i> .....	27
<b>Tabla 4. 3.</b> Caracterización macroscópica en MSM.....	29
<b>Tabla 4. 4.</b> Caracterización macroscópica en MSM.....	30
<b>Tabla 4. 5.</b> Resumen del análisis de varianza (ANOVA).....	35

### CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 3. 1.</b> Esquema de procesos (Fase II.), cepas de <i>Bacillus sp.</i> (DEE-71, T-29, T-13, GA- 52, T-21).....	17
<b>Figura 3. 2.</b> Inoculación de cepas <i>Bacillus sp.</i> en MSM enriquecido con PET.....	20
<b>Figura 3. 3.</b> Procedimiento para el proceso de biodegradación de láminas PET.....	21
<b>Figura 4. 1.</b> Morfología de <i>Bacillus sp.</i> : a) T-13, b) T-29, c) DEE-71, d) GA-52, e) T-21.....	25

### CONTENIDO DE ECUACIONES

<b>Ecuación 2. 1.</b> Diferencia de masas. ....	13
<b>Ecuación 2. 2.</b> Porcentaje de pérdida de peso. ....	13
<b>Ecuación 3. 1.</b> Transformación de raíz cuadrada. ....	23
<b>Ecuación 3. 2.</b> Transformación de raíz cuadrada. Estabilización de la varianza de Poisson....	23
<b>Ecuación 3. 3.</b> Transformación de raíz cuadrada (Aplicada en el estudio). Estabilización de la varianza de Poisson. ....	23

### CONTENIDO DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 4. 1.</b> Media del porcentaje de Pérdida de Peso (%Pp) por Tratamiento. ....	32
<b>Gráfico 4. 2.</b> Porcentaje de pérdida de peso promedio (%Pp) y los periodos de tiempo de evaluación (15, 30 y 45 días).....	34

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por medio de *Bacillus sp.* aislados de la Antártida. Esta investigación fue de tipo experimental, enfoque científico sobre un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) unifactorial y tres bloques (15, 30 y 45 días). Como tratamientos se consideraron cinco cepas del género *Bacillus sp.* (DEE-71, T-29, T-13, GA-52, T-21) y control. El material principal fueron las láminas de PET que se sometieron a tratamiento con las bacterias en medio enriquecido y mineral en condiciones de temperatura ambiente de 20°C y a 180 rpm. La biodegradación se evaluó mediante el porcentaje de pérdida de peso y observación por microscopía óptica durante 2 meses. Del mismo modo, los datos se llevaron a un análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey con 95% de confianza. El porcentaje de biodegradación del PET que se determinó después de 45 días fue 0.4000%; 0.4250%; 0.0750%; 0.3250%; 0.2750%; 0.0000%, respectivamente, para las cepas anteriormente mencionadas y el control. Asimismo, se comprobó indicios de biodegradación en las muestras de PET, tales como: deterioro, fisuras y surcos. Finalmente, los resultados del presente estudio revelaron cambios sobre la estructura polimérica mediante la capacidad biodegradadora de las bacterias.

**Palabras clave:** Polietileno tereftalato, *Bacillus sp.*, biodegradación, estructura polimérica.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biodegradation of polyethylene terephthalate (PET) by means of *Bacillus sp.* isolated from Antarctica. This research was of an experimental type, scientific approach on a unifactorial Completely Random Block Design (RCBD) and three blocks (15, 30 and 45 days). As treatments, five strains of the genus *Bacillus sp.* (DEE-71, T-29, T-13, GA-52, T-21) and control. The main material was the PET sheets that were subjected to a treatment with the bacteria in an enriched and mineral medium under room temperature conditions of 20°C and at 180 rpm. The biodegradation was evaluated by means of the percentage of weight loss and observation by light microscopy for two months. In the same way, the data were taken to an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test with 95% confidence. The percentage of biodegradation of the PET that will continue after 45 days was 0.4000%; 0.4250%; 0.0750%; 0.3250%; 0.2750%; 0.0000%, respectively, for the above-mentioned strains and the control. Likewise, signs of biodegradation were verified in the PET samples, such as: deterioration, fissures and grooves. Finally, the results of the present study revealed changes in the polymeric structure through the biodegrading capacity of the bacteria.

**Keywords:** Polyethylene terephthalate, *Bacillus sp.*, biodegradation, polymeric structure.



# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## 1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En el transcurso de las últimas décadas, la creciente producción y el uso de plásticos alrededor del mundo han ido en aumento de manera alarmante, siendo un recurso esencial dentro de la sociedad dado las diferentes aplicaciones que este presenta (Soriano, 2020), convirtiéndose en una de las industrias más grandes que alcanzó a nivel mundial una producción de 370 millones de toneladas de plástico para el año 2019 (Espinoza, 2018; Mena, 2021; Plastics Europe, 2020). No todo el plástico se puede reciclar, por lo que tan solo el 9% de toda la producción anual es aprovechable y el 91% restante son incinerados o reposan en vertederos, mares, ríos, entre otros (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], 2019).

Con los años, el plástico se ha consolidado por sus propiedades y características, esto permite que sean resistentes a diferentes condiciones ambientales (Butron, 2020). Tal es el caso del polietileno PET que muestra cualidades de durabilidad al esfuerzo mecánico, densidad y alta estabilidad, condiciones que hacen su producción sea mayor facilitando la cultura de “usar y tirar” que altera el proceso de degradación del plástico, dado que este apenas inicia y ya se producen muchos más (Rocha y Peña, 2020). La resistencia de este tipo de plástico permite que dure más de 700 años en degradarse (Bermúdez y Sandoval, 2021) provocando una acumulación masiva en el ambiente que contribuye a una amenaza para la biodiversidad (Rodríguez, 2019)

En América Latina se producen alrededor de 17,000 t de residuos plásticos entre ellos PET, que en su mayoría van desde las aguas superficiales hasta los sedimentos de aguas profundas, causando impactos en el medio marino, en la alimentación y salud (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], 2021). Al ser la mayoría de plásticos un producto derivado del petróleo hace que su efecto contaminante perdure en el ambiente generando problemas de gases en la atmósfera (metano y etileno) que contribuyen al efecto

invernadero y otros problemas ambientales como la bioacumulación y efectos toxicológicos por microplásticos, etc (Castañeta et al., 2020; Lavayen, 2021).

En 2019, la generación de residuos plásticos del Ecuador fue de 528,000 t lo que equivale al 11% de todos los residuos que se generan, producto de la utilización diaria de por lo menos dos elementos plásticos desechables (López et al., 2020) a base de PET que son los de mayor generación en la fabricación de envases de agua, refrescos, y de líquidos en general (Ormaza et al., 2020).

Por lo consiguiente, se requiere emplear biotecnologías que aporten a la buena gestión y reducción de estos residuos (Andrade y Vélez, 2017), desarrollando métodos que favorezcan a la degradación del plástico en menor tiempo. Los microorganismos, en especial las bacterias por sus capacidades metabólicas o enzimáticas se estudian como agentes ambientales capaces de biodegradar sustancias químicas que son introducidas en el entorno, como ciertos compuestos que forman parte de los plásticos (Atanasova et al., 2021; Urbanek et al., 2018).

Con todo lo anteriormente indicado, más los daños y efectos por la acumulación de plásticos en los ecosistemas y la tardía degradación en la naturaleza se plantea la siguiente interrogante: ¿Cómo se comportan las bacterias antárticas (*Bacillus sp.*) en la biodegradación de polietileno PET?

## **1.2. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, el manejo frecuente del polietileno PET ha contribuido a un sinnúmero de beneficios para las personas, principalmente por las ventajas y características que posee (Urbanek et al., 2018). Por otro lado, la gran demanda y durabilidad que este material ejerce a nivel mundial es impresionante, afectando especialmente al medioambiente (Butron, 2020).

A partir de ello, las investigaciones se han encaminado en hallar alternativas de reducción, reutilización y reciclaje (López et al., 2020), además de los procesos de degradación como: mecánicos, químicos, térmicos, fotoquímicos y biodegradación (Herrera y Ospina, 2019). De modo particular, este último ha

adquirido importancia debido a que no necesita un elevado consumo energético y tampoco emite altos niveles de concentración de metano y etileno.

Considerando lo anteriormente expuesto, la biodegradación es un proceso viable capaz de combatir la contaminación por plástico (Ávila y Morán, 2021). Específicamente, los estudios incitan al uso de bacterias por lo que favorecen a la capacidad de biodegradar estos polímeros de forma rápida y efectiva (Flashman, 2018). Se ha demostrado que, las bacterias psicrófilas favorecen a la biodegradación de plástico, pues su enfoque radica en aprovechar los compuestos biológicos y enzimas, producidas por estas que actúan en ambientes fríos y que han desarrollado mecanismos de adaptación y una bioquímica adecuada (Barbarán et al., 2018; Moreno, 2017).

En esta investigación se aplicará el Art. 14 de Constitución de la República del Ecuador (2008) “Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*” y anexo el “Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025”, Objetivo 3, el que indica “Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones” (Secretaría Nacional de Planificación, 2021).

Con este aporte, se busca evaluar la biodegradación de polietileno PET por medio de *Bacillus sp.* aislados de la Antártida. En Ecuador, no se ha profundizado este estudio de la biodegradación por bacterias psicrófilas, por lo tanto, conllevó a indagar más sobre este estudio.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la biodegradación de polietileno PET por medio de *Bacillus sp.* aislados de la Antártida.

#### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar bacterias *Bacillus sp.* presentes en muestras de suelo de la Antártida.

- Determinar la capacidad biodegradadora de *Bacillus sp.* en medio enriquecido con PET.
- Analizar la eficiencia de la biodegradación del PET en relación a la pérdida de peso y observación microscópica de los mejores resultados encontrados.

## **1.4. HIPÓTESIS**

### **1.4.1. HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Las bacterias (*Bacillus sp.*) muestran capacidad de biodegradar polietileno PET.

### **1.4.2. HIPÓTESIS NULA**

Las bacterias (*Bacillus sp.*) no muestran capacidad de biodegradar polietileno PET.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. PLÁSTICOS

Son compuestos que poseen estructuras sólidas, es decir, forman el conjunto de polímeros sintéticos comúnmente caracterizados por una alta durabilidad, flexibilidad y resistencia (Martínez, 2017). American Society for Testing and Materials [ASTM] (2018) define a este término como “cualquier material que contiene como elemento esencial una sustancia orgánica de gran peso molecular, siendo sólida en su estado final”.

Los plásticos se distinguen por presentar una relación entre la resistencia y densidad alta; propiedades ideales para el aislamiento térmico y eléctrico, resistencia frente a los ácidos, bases y disolventes; poseen una baja conductividad térmica y eléctrica; y no soportan altas temperaturas (González, 2019).

Para la Asociación Ecuatoriana de Plásticos [ASEPLAS] (2020), la industria fabrica 546,648 t/año aproximadamente, es decir, cada persona representa un consumo per cápita anual de 20 kg. Lo que demuestra la importante participación de esta producción, donde frecuentemente se desarrolla en variedad y económicamente accesibles (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2020).

#### 2.1.1. TIPOS DE PLÁSTICOS

Luna (2020) indica que la elaboración del plástico se ha incrementado con el pasar del tiempo. Asimismo, Mendoza (2020) detalla los tipos de plásticos más utilizados que se muestran en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2. 1.** Tipos de plásticos y usos más comunes.

Tipo de plástico	Usos más comunes
Polipropileno (PP)	Envasado de alimentos, envolturas de dulces y bocaditos, tapers.
Poliétileno de baja densidad (PE-LD)	Bolsas reutilizables, bandejas, recipientes de basura, redes, botellas.
Poliétileno de alta densidad (PE-HD)	Juguetes, botellas de leche y de champú, tuberías.
Policloruro de vinilo (PVC)	Marcos de ventanas, tuberías, aisladores de cables, mangueras de jardín.
Poliuretano reticulado (PUR)	Aisladores de edificios, almohadas y colchones.
Tereftalato de polietileno (PET)	Botellas para agua, jugos, refrescos y para limpiadores.
Poliestireno (PS) y Poliestireno expandido (EPS)	Embalaje de alimentos, equipos eléctricos y electrónicos, monturas de lentes.
Nylon	Mallas, cuerdas sintéticas para instrumentos musicales, tornillos, palas de ventiladores.
Poliéster Termoplástico (TPE)	Botellas de bebidas, tuberías anticorrosivas y fabricación de pinturas.
Acetato de celulosa	Filtros de cigarrillos, fibras y textiles.
Otros	Fibras ópticas, pantallas táctiles, revestimiento de cables en telecomunicaciones, implantes médicos, dispositivos quirúrgicos.

Fuente: (Mendoza, 2020).

### 2.1.2. IMPACTOS DEL PLÁSTICO EN EL AMBIENTE

Debido a las propiedades y características que conservan los plásticos, generan impactos ambientales y consecuencias en los ecosistemas (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], 2018). Dando lugar a efectos negativos como la contaminación, disminución y pérdida de los factores bióticos y abióticos que son importantes en los procesos ecosistémicos (Picó y Barceló, 2019).

De acuerdo con Rivas y Garelli (2021), los impactos ambientales del plástico más significativos son: problemas cutáneos, consumo de plásticos en la ingestión de alimentos, formación de islas de basura y degradación de los ecosistemas.

## 2.2. POLIETILENO TEREFTALATO

Barbarán *et al.* (2018) aseguran que el polietileno tereftalato (PET), es un polímero termoplástico que se consigue a partir de la reacción de policondensación del ácido tereftálico y el etilenglicol. En 1941 Whinfield y Dickson lo descubrieron; para 1951 se empezó a utilizar como un material para almacenar alimentos y desde 1976 se maximizó su utilidad (Aldaz, 2019).

El PET integra la familia del poliéster y comprende una estructura termoplástica semicristalina, siendo una fibra liviana con resistencia mecánica al aplastamiento y golpes (Martínez, 2017). Libera (2019) menciona que, 1 kg de PET consta del 64% de petróleo, 23% de soluciones resultantes del gas natural y 13% de aire, sin embargo, estos porcentajes han variado con el pasar de los años según corresponda el producto final.

### 2.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL PET

El PET, se caracteriza por ser un material ligero, resistente a la compresión y tenacidad, buen nivel de transparencia y brillo, mantiene el sabor y aroma de los alimentos, peso molecular, barrera a los gases, etc (García, 2021).

Suasnavas (2017) indica las propiedades físicas y químicas del PET de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 2. 2.** Propiedades físicas y químicas del PET.

<b>Resistencia al ataque químico</b>	<b>Resistente a:</b> combustibles, alcoholes, grasas, éteres ácidos y bases diluidas.
<b>Solubilidad</b>	<b>Insoluble:</b> solventes orgánicos <b>Solubilidad en menor grado:</b> solventes halogenados, aromáticos, cetonas ácidas y bases fuertes.
<b>Resistencia al envejecimiento</b>	<b>Buena resistencia:</b> Temperatura ambiental, radiaciones solares, humedad
<b>Estabilidad térmica</b>	Estable a temperaturas $\leq 71^{\circ}\text{C}$ Cristalizado estable a temperaturas $\leq 230^{\circ}\text{C}$
<b>Permeabilidad</b>	Excelente barrera al $\text{CO}_2$ y $\text{O}_2$
<b>Densidad</b>	<b>Estado amorfo:</b> 1.33 – 1.37 g/cm <sup>3</sup> <b>Estado cristalino:</b> 1.45 – 1.51 g/cm <sup>3</sup>
<b>Conductividad térmica</b>	<b>Buen aislamiento térmico</b> = 0.24 W/m x K
<b>Absorción de agua</b>	< 0.7 % durante 24 horas
<b>Propiedades ópticas</b>	<b>Transmisión de luz:</b> 89% <b>Índice de refracción:</b> 1.576
<b>Propiedades biológicas</b>	No presenta vulnerabilidad al ataque microbiológico

Fuente: (Suasnavas, 2017).

### 2.2.2. MÉTODOS DE DEGRADACIÓN

Según Palma y Tenesaca (2020), el PET es considerado un material reciclable, sin embargo, no es tan sencilla su descomposición por lo que a continuación se detallan los métodos de degradación más relevantes:

- **Degradación ambiental:** este tipo de degradación se desarrolla por la predominancia de factores naturales o en tal caso, ha finalizado su ciclo de vida, su dependencia radica en el tipo de polímero.
- **Degradación física:** abarca los fenómenos que reaccionan con el polímero, aunque no cambiando la estructura química de la molécula; otro parámetro importante es la temperatura, pues esta permite cuantificar los cambios físicos; asimismo en cuanto a las fuerzas mecánicas y de radiaciones, aquellas que interactúan con las cargas estáticas o dinámicas.
- **Degradación biológica:** proceso natural que descompone un material en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), agua (H<sub>2</sub>O) y constituyentes orgánicos, debido a la acción enzimática de los microorganismos.

## 2.3. BIODEGRADACIÓN

Considerada como la transformación bioquímica de los compuestos frente a la presencia de microorganismos (Barbarán et al., 2018). De este modo, se define a la biodegradación como un proceso complejo en que pueden identificarse las siguientes fases: biodeterioro, biofragmentación, asimilación y mineralización (Pérez, 2020).

Butron (2020) enfatiza que, la biodegradación de plásticos como el PET, es un proceso prácticamente múltiple y diverso, la falta de solubilidad en agua y el tamaño de las moléculas del polímero impiden que los microorganismos capten el material directamente, por lo que es imprescindible que exista una liberación de enzimas, aquellas que empiecen el proceso de degradación del polímero. Es así que, actualmente la biodegradación representa una de las opciones más prometedoras, por ser una alternativa ecológica y económica (Farzi et al., 2019).

### 2.3.1. BIOPELÍCULA

La biopelícula o biofilm, es considerada un conjunto de comunidades bacterianas altamente estructuradas y encapsuladas en una matriz extracelular de polisacáridos fibrosos (o matriz polimérica auto-producida) que puede adherirse



a superficies vivas e inertes (Fernández, 2021). Esta matriz, también denominada cápsula o glicocálix, es sintetizada por las bacterias presentes en el medio y su primordial actividad es sujetar las células adsorbidas al soporte (Mayhuire et al., 2019).

Estudios han demostrado que, las biopelículas bacterianas poseen resistencia y se ven beneficiadas ante entornos con presencia de plásticos o microplásticos (Altieri, 2020).

### 2.3.2. FASES DE BIODEGRADACIÓN DEL PLÁSTICO

La biodegradación en los polímeros se caracteriza por algunas fases, aquellas que se describen a continuación (Arias y Vásquez, 2018; Hernández y Martín, 2021):

- **Biodeterioro:** se visualiza la presencia de biopelículas microbianas en la superficie de la película plástica, demuestra los cambios de las propiedades físicas, químicas y mecánicas. Para esto, es importante tener en cuenta que la formación de esta, dependerá de las condiciones ambientales que se sujete el material.
- **Biofragmentación:** es la actividad catalítica de las enzimas microbianas sobre los polímeros plásticos.
- **Mineralización y Bioasimilación:** o también denominado como fase de desintegración. Son el proceso dependiente de la capacidad de adaptación de los microorganismos a condiciones aerobias o anaerobias. Asimismo, representan al consumo del polímero como sustrato por los microorganismos.

### 2.4. BACTERIAS PSICRÓFILAS

La palabra psicrófilos se refiere a organismos que están adaptados al frío y que permanecen constantemente en temperaturas de 5°C o menores, conocidos también como criófilos o extremófilos por desarrollarse en los lugares más fríos del planeta como aguas oceánicas, glaciares, permafrost y la Antártida, siendo de gran importancia para estos ecosistemas (Ramos, 2019).

Poseen una temperatura óptima de crecimiento en rango de 15 a 20 °C lo más cercano a la temperatura ambiente, su capacidad extremófila también le permite desarrollarse en temperaturas inferiores con fluctuaciones (Torres y Avendaño, 2019). La resistencia de estos microorganismos a las bajas temperaturas está dada por la síntesis de proteínas originada en los ribosomas que ayudan al crecimiento de la bacteria en el frío y le permiten soportar el shock térmico, así también en su membrana existe una producción de cadenas más cortas de ácidos grasos insaturados (Silva, 2020).

## 2.5. *Bacillus*

El género *Bacillus* fue descubierto por Julius Cohn entre los años 1870 y 1880, este género al tener una gran variedad ecológica puede subdividirse en varios grupos entre los que se consideran el *Bacillus censo* donde se puede encontrar el *Bacillus subtilis*, también está el *Bacillus sensu lato* que agrupa bacterias específicamente termófilas, mientras que en otros dos grupos se pueden hallar especies nuevas entre las que se destacan *B. horti*, *B. carboniphilus*, *B. chitinolyticus* y *B. infernus* (Plaza, 2019).

Las bacterias de este género son universales dada la capacidad que poseen para formar esporas, permitiendo vivir en el ambiente por mayor tiempo también poseen la capacidad de biodegradar plástico paulatinamente, modificando su estructura y volviéndose vulnerables hasta que desaparecen como residuo (Campos y Cieza, 2017). La siguiente tabla muestra la clasificación taxonómica de *Bacillus sp.*

**Tabla 2. 3.** Taxonomía *Bacillus sp.*

<b>Reino:</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo:</b>	Firmicutes
<b>Clase:</b>	Bacilli
<b>Orden:</b>	Bacillales
<b>Familia:</b>	Bacillaceae
<b>Género:</b>	<i>Bacillus</i>

**Fuente:** (Caicedo y Chacón, 2017).

### **2.5.1. ECOLOGÍA DE *Bacillus* sp.**

Debido a la habilidad de formar esporas el género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, lo que permite habitar y resistir en diferentes hábitats sean estos terrestres o acuáticos, e incluso ambientes extremos como bajas y altas temperaturas ya que poseen genes de shock térmico que les permite adaptarse a varios cambios. En temperaturas bajas el crecimiento de estos microorganismos es lento, pero esto permite modificaciones estructurales que le ayudan a desarrollarse en diferentes condiciones (Collaguazo y Tenorio, 2018; Villarreal et al., 2018).

### **2.5.2. MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS**

El género *Bacillus* sp. conforman bacterias Gram positivas en forma de bastón, son formadoras de endosporas que varían según la especie, pueden ser ovaladas, elipsoidales, cilíndricas o esféricas. En cuanto a las colonias poseen diferentes formaciones de acuerdo a la cepa o especie llegan a ser grandes, grises y con aspecto húmedo, su crecimiento en medios líquidos permite ver una solución turbia (Vergara, 2018). La temperatura de crecimiento puede ir entre los 25 - 37 °C y 37 – 41 °C, el pH puede situarse entre 4 – 7 y 7 – 10, y la revolución por minuto se establecería de 50 – 150 rpm y 150 – 200 rpm (Collaguazo y Tenorio, 2018; Tan et al., 2020).

La movilidad en algunas bacterias *Bacillus* se lleva a cabo a través de flagelos peritricos, otras son inmóviles, su crecimiento se puede dar en un medio con condiciones favorables, tales como un agar nutritivo y agar sangre. Por lo común la mayoría de este género son aislados de muestras de suelo, sin embargo también se hallan en muestras de agua alimentos y muestras clínicas, a excepción de *Bacillus anthracis* gran parte de estas bacterias no son patógenas por lo que no suelen asociarse con enfermedades humanas (Gamarra, 2020).

## **2.6. MEDIOS DE CULTIVO**

Los medios de cultivo son compuestos nutritivos que se utilizan en el laboratorio con el fin de permitir el crecimiento de microorganismos, sean estas bacterias,

hongos o virus (Chero, 2019). Para el desarrollo adecuado hay que considerar sus requerimientos nutricionales en las cantidades y condiciones adecuadas (Checa, 2018).

Los medios de cultivo básicamente están constituidos por fuentes de carbono, nitrógeno y minerales, este debe considerarse de acuerdo a la necesidad de la bacteria (Rodríguez y Zhurbenko, 2018). Uno de los requerimientos más importantes es la fuente de carbono siendo que compone la estructura básica de la vida y se requiere para llevar a cabo compuestos orgánicos, posterior a ello el nitrógeno es el siguiente elemento con más abundancia requerido para la síntesis celular, mientras que para las actividades enzimáticas se requiere de minerales como; hierro, cobre, molibdeno, magnesio y zinc (Cobo, 2017).

Aparte de los nutrientes principales los medio de cultivo deben poseer una serie de condiciones que son importantes en el desarrollo del microorganismo tales como; temperatura, pH, humedad y presión de oxígeno apropiadas (Bastidas y Vaca, 2018).

**Tabla 2. 4.** Tipos de medios de cultivo.

<b>SEGÚN SU ORIGEN</b>	
<b>SINTÉTICOS</b>	– Requieren una composición química a base de carbono, nitrógeno y minerales.
<b>SEGÚN SU CONSISTENCIA</b>	
<b>LÍQUIDOS</b>	– Son caldos que poseen nutrientes en solución acuosa.
<b>SEGÚN SU UTILIDAD</b>	
<b>SIMPLE</b>	– Es utilizado con mayor frecuencia ya que posee los requerimientos necesarios para el crecimiento de bacterias. Son agar y caldos nutritivos.
<b>ENRIQUECIDOS</b>	– A este tipo de medio se puede agregar otros nutrientes y suplementos como; sangre, suero, líquido ascítico, glucosa, etc.

Fuente: (Chero, 2019; Rodríguez y Zhurbenko, 2018).

## 2.7. MECANISMOS DE EVALUACIÓN

Una muestra de plástico que ha pasado por un proceso de biodegradación, a simple vista puede ser difícil de observar algún cambio, especialmente

considerando un tiempo de exposición corto ante los microorganismos en estudio (Espinoza, 2018).

### 2.7.1. MICROSCOPIO ÓPTICO

Un microscopio es un instrumento que amplifica la imagen de un objeto poco visible a simple vista, como los microorganismos (Cano, 2021).

El microscopio óptico o microscopio de luz, se considera como el tipo de microscopio más usado debido a la facilidad de acceso y manejo (Aravena et al., 2017). Además, tiene un límite de resolución aproximadamente de 200 nm, este se encuentra determinado por la longitud de onda de la luz y de la apertura numérica de la lente (Isac, 2018). La mayoría de estos microscopios tienen oculares de aumento de 10 a 15x y objetivos de 5 a 100x aumentos (Hernández et al., 2020).

### 2.7.2. PÉRDIDA Y PORCENTAJE DE PESO

Calcetero y Mancera (2021) indican que la pérdida de peso de una muestra se presenta durante un periodo de degradación, por lo que se registra como un indicador.

De manera cuantitativa se considera la ecuación general de diferencia de masas (Ecuación 2.1.) y a partir de esta se indica el porcentaje de la pérdida de peso (Ecuación 2.2.) que tiene un material en estudio (Bermúdez y Sandoval, 2021; Crespo, 2021).

$$P_P = P_I - P_F \quad [2.1.]$$

**Ecuación 2. 1.** Diferencia de masas.

$$\%P_P = \frac{P_I - P_F}{P_I} * 100 \quad [2.2.]$$

**Ecuación 2. 2.** Porcentaje de pérdida de peso.

**Donde:**

$P_P$  : Pérdida de peso (mg).

$P_I$  : Peso inicial (mg).

$P_F$  : Peso final (mg).

$\%P_P$  : Porcentaje de pérdida de peso (%).

# CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

## 3.1. UBICACIÓN

Esta investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular de la ESPAM MFL, la cual se encuentra situada en el sitio “El Limón” del cantón Bolívar, provincia de Manabí.

Tabla 3. 1. Características Climatológicas del Campus Politécnico.

Características	Campus Politécnico
Coordenadas geográficas	<b>Sur:</b> 0°49'8.87" <b>Oeste:</b> 80°10'53.03"
Altitud	15 msnm
Temperatura	<b>Mínima:</b> 31.11 °C <b>Máxima:</b> 20.60 °C
Precipitación	624 mm
Humedad relativa	82.42 %

Fuente: (Valdivieso et al., 2021).

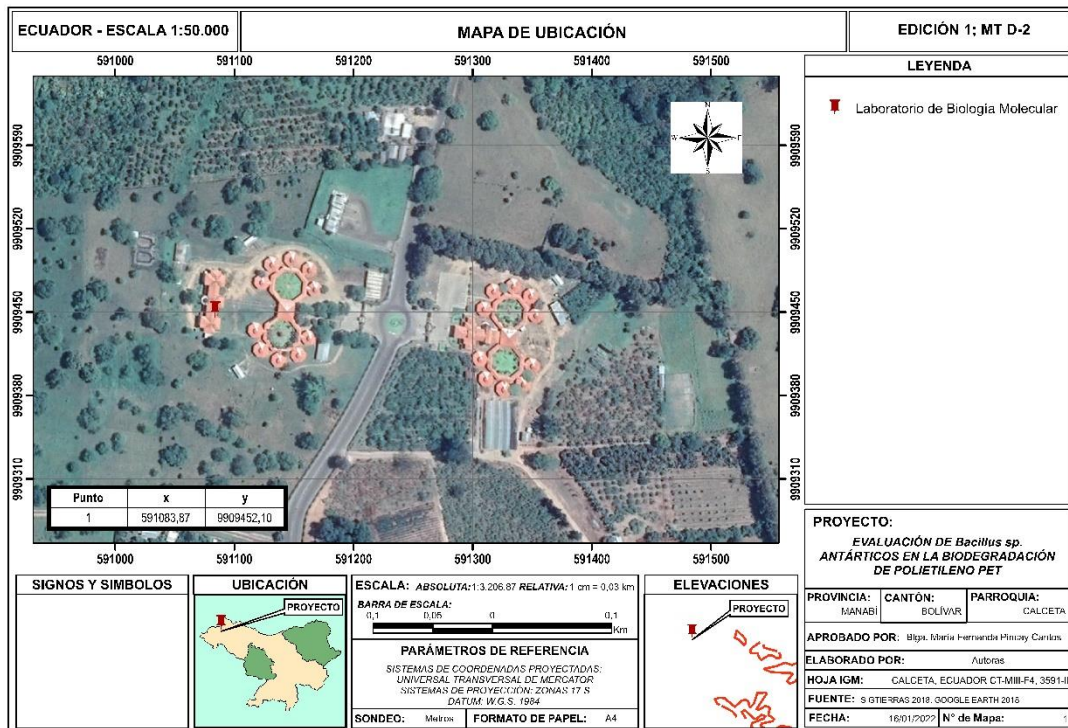


Figura 3. 1. Laboratorio de Biología Molecular ESPAM MFL.  
Fuente: (Google Earth, 2018; Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2018).

## 3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación fue experimental, por lo que se manipularon las variables de estudio y tuvo un enfoque científico, pues se evaluó la biodegradación de polietileno PET por medio de *Bacillus sp.* aislados de la Antártida, en condiciones de laboratorio de acuerdo con (Álvarez, 2020).

## 3.3. DURACIÓN

La investigación tuvo un período de duración de nueve meses.

## 3.4. MÉTODOS

### 3.4.1. MÉTODO EXPLORATIVO

Se utilizó para recopilar información de diferentes fuentes confiables, de la misma manera este método se utilizó para analizar los resultados de la investigación (Vásquez, 2020).

### 3.4.2. MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Se aprovechó para determinar el deterioro presente en el PET, producto de la intervención bacteriana (Rivas, 2020).

Además, se registró un peso inicial de las láminas durante el proceso de preparación de las mismas y después de ser sometidas al proceso de biodegradación se tomó el peso final (Ecuación 2.1.) (Espinoza, 2018). Posteriormente, se obtuvo el porcentaje de biodegradación (Ecuación 2.2.), ecuación establecida por Bermúdez y Sandoval (2021); Crespo (2021):

$$P_p = P_i - P_f \quad [2.1.]$$

$$\%P_p = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \quad [2.2.]$$

### 3.4.3. MÉTODO ESTADÍSTICO

Se empleó para la tabulación, análisis de datos y elaboración de gráficos, etc (Uribe et al., 2013).

## **3.5. TÉCNICA**

### **3.5.1. MICROSCOPIA ÓPTICA**

Esta técnica permitió observar la morfología bacteriana y su reacción al Gram, utilizando el objetivo de inmersión (100X) (Stewars, 2020).

Asimismo, se pudo visualizar los fragmentos de PET, con la finalidad de apreciar el cambio, agrietamiento o fisura en la superficie del polímero, con un aumento de 100X (Rivas, 2020).

## **3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL**

La unidad experimental se representó con tubos de ensayo, en cada tubo se agregó 12 ml del medio de sales minerales, 2 ml del medio enriquecido con las bacterias adaptadas, la lámina de PET y se los cubrió con tapones de algodón.

## **3.7. MANEJO DEL EXPERIMENTO**

### **3.7.1. FASE I. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS *Bacillus sp.* PRESENTES EN MUESTRAS DE SUELO DE LA ANTÁRTIDA**

#### **3.7.1.1. ACTIVIDAD 1. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS Y TINCIÓN DE GRAM**

Para llevar a cabo la presente fase se consideró bacterias del género *Bacillus sp.*, presentes en el banco de muestras de la ESPAM MFL obtenidas a partir de la expedición realizada a la Antártida, específicamente de las islas: DEE (DEE-71), GREENWICH (GA- 52) y TORRES (T-13, T-21, T-29), en el año 2014 y conservadas a una temperatura de -20°C.

Seleccionadas las cepas se sembró utilizando Agar Nutritivo para luego llevarlas a incubación a 37 °C por un periodo de 72 horas, posterior a ello se aplicó la prueba de tinción de Gram. De acuerdo a Rodríguez y Arenas (2018) para llevar a cabo este último punto se establecieron los siguientes pasos:

- Se fijó la muestra a la flama.



- Se cubrió con cristal violeta durante 1 minuto y se lavó con agua destilada.
- Se cubrió con lugol durante 1 minuto y se lavó con agua destilada.
- Se cubrió con alcohol durante 30 segundos y se lavó con agua destilada.
- Se cubrió con safranina durante 1 minuto y se lavó con agua destilada.

Luego de haber cumplido con todos los pasos se visualizó las muestras con el objetivo de identificar si eran bacterias Gram positivas o Gram negativas.

### 3.7.2. FASE II. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE *Bacillus sp.* EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET

En el desarrollo de esta fase se siguió el siguiente esquema de trabajo:

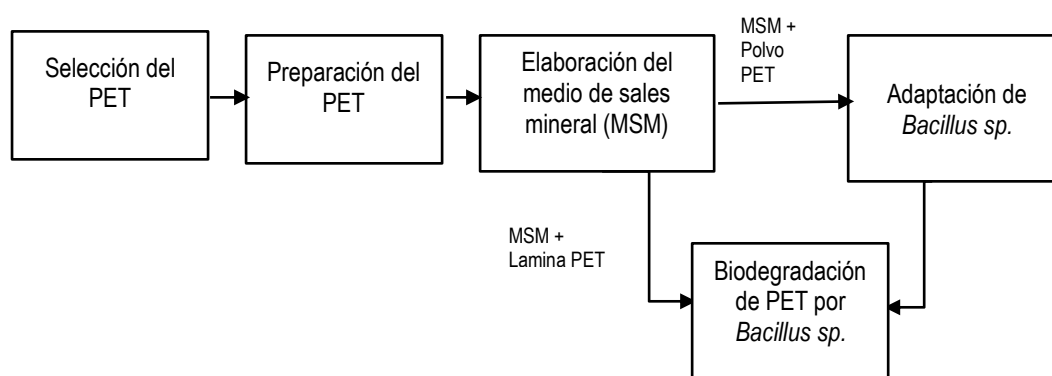


Figura 3. 1. Esquema de procesos (Fase II.), cepas de *Bacillus sp.* (DEE-71, T-29, T-13, GA- 52, T-21).  
Elaborado por: las autoras.

#### 3.7.2.1. ACTIVIDAD 2. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE PET

Como material sujeto a biodegradación, se tomó en cuenta botellas plásticas sin uso de la categoría PET con codificación 1 y sin coloración, dado que los aditivos que se adicionan para dar color en botellas de algunos refrescos pueden interferir en el desarrollo del experimento (Bermúdez, 2021), por ello se consideraron específicamente botellas de agua de 500 ml, al ser las de mayor uso en el consumo de esta bebida.

### 3.7.2.2. ACTIVIDAD 3. PREPARACIÓN DEL PET

Este punto se realizó en dos etapas, la primera al inicio del experimento con la preparación de polvo PET y la segunda luego de 15 días para la preparación de láminas a partir de las botellas. Las preparaciones se detallan a continuación:

**Preparación de polvo PET.** - Para la obtención de polvo plástico, se procedió a retirar el pico y la base de la botella este se cortó a lo largo y posteriormente a la mitad, cada mitad fue doblada e introducida en el conducto de alimentación de un extractor Hamilton que procesó el material hasta lograr el polvo PET. El polvo obtenido fue pasado por un tamiz de 0.5 mm de diámetro (Peraza, 2017). El tamizado fue pesado y luego esterilizado con radiación UV por un periodo de 30 minutos (Gómez y Oliveros, 2018). El polvo se conservó en placas Petri estériles hasta ser utilizado.

**Preparación de láminas.**- La preparación de las láminas se llevó a cabo cortando las botellas en rectángulos de 1x2 cm, que posteriormente fueron pesadas con el uso de una balanza analítica (MKLAB, modelo MA-2204N) para la obtención del peso inicial (Peraza, 2017) y luego esterilizados donde se lavaron las láminas con agua destilada y se sometieron a radiación UV por un periodo de 30 minutos (Gómez y Oliveros, 2018). Se conservaron las láminas para su posterior uso en el proceso de biodegradación.

### 3.7.2.3. ACTIVIDAD 4. ELABORACIÓN DEL MEDIO DE SALES MINERALES

Se preparó un medio de crecimiento que estuvo provisto de sales minerales. La utilización de un medio mineral permite la purificación del proceso ya que disminuye la posibilidad de que otros microorganismos intervengan en el estudio (Espinoza, 2018).

El medio mineral para 1 litro de agua destilada estuvo formado por los siguientes compuestos:

**Tabla 3. 2.** Medio de sales minerales.

ESPECIE	CANTIDAD
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g
FeSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.002 g
NaCl	0.005 g
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.7 g
MnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.001 g
ZnSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.002 g

Fuente: (Crespo, 2021).

Todos los medios se esterilizaron mediante el uso de autoclave a 121°C por 15 minutos (Crespo, 2021).

#### **3.7.2.4. ACTIVIDAD 5. ADAPTACIÓN DE *Bacillus sp.* EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET**

Se requirieron cinco matraces estériles de 250 ml que fueron debidamente rotulados de acuerdo a las 5 cepas de *Bacillus sp.* (DEE-71, T-29, T-13, GA- 52, T-21) que se utilizaron en el experimento.

Para mantener la esterilidad del proceso se trabajó dentro de una cabina de flujo laminar, donde a cada matraz se añadió 150 ml del medio de sales minerales que fue enriquecido con 0.3 g del polvo de PET previamente preparado y esterilizado, convirtiéndose la única fuente de carbono para cada cepa, posteriormente se procedió a inocular las cepas de *Bacillus sp.* a razón de 1 ml por cepa en cada matraz del medio enriquecido con PET, se controló el pH y se llevó a incubación por un periodo de 15 días a 37° C y 150 rpm (Meza, 2013; Palacios y Prado, 2018). Cumplidos los 15 días de adaptación se realizó un frotis para comprobar el crecimiento de la bacteria en el medio de MSM.

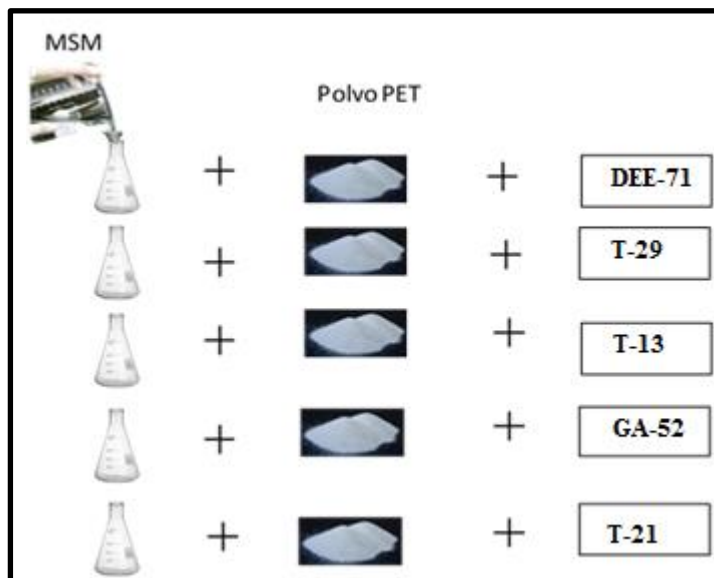


Figura 3. 2. Inoculación de cepas *Bacillus sp.* en MSM enriquecido con PET.  
Elaborado por: las autoras.

### 3.7.2.5. ACTIVIDAD 6. BIODEGRADACIÓN DE PET POR *Bacillus sp.*

Concluido el periodo de adaptación de las bacterias *Bacillus sp.*, se procedió hacer la prueba de biodegradación, para lo que se usaron 72 tubos de ensayo y 72 láminas de PET que fueron anteriormente recortadas y esterilizadas.

Se mantuvo la esterilidad del proceso trabajando dentro de una cabina de flujo laminar, en cada tubo de ensayo se añadieron 12 ml del medio de sales minerales, luego con ayuda de una pinza se colocó dentro una lámina de PET, posteriormente se inocularon 2 ml del medio enriquecido con las bacterias adaptadas lo que completó un total de 14 ml en cada tubo de ensayo, para el caso del control no se añadieron las bacterias, finalmente se llevaron a incubación a temperatura ambiente de 20°C controlando el pH y con agitaciones de 180 rpm durante 15, 30 y 45 días (Meza, 2013; Palacios y Prado, 2018), que fueron los periodos en el que las bacterias mostraron formación de biopelícula y turbidez del medio de cultivo.

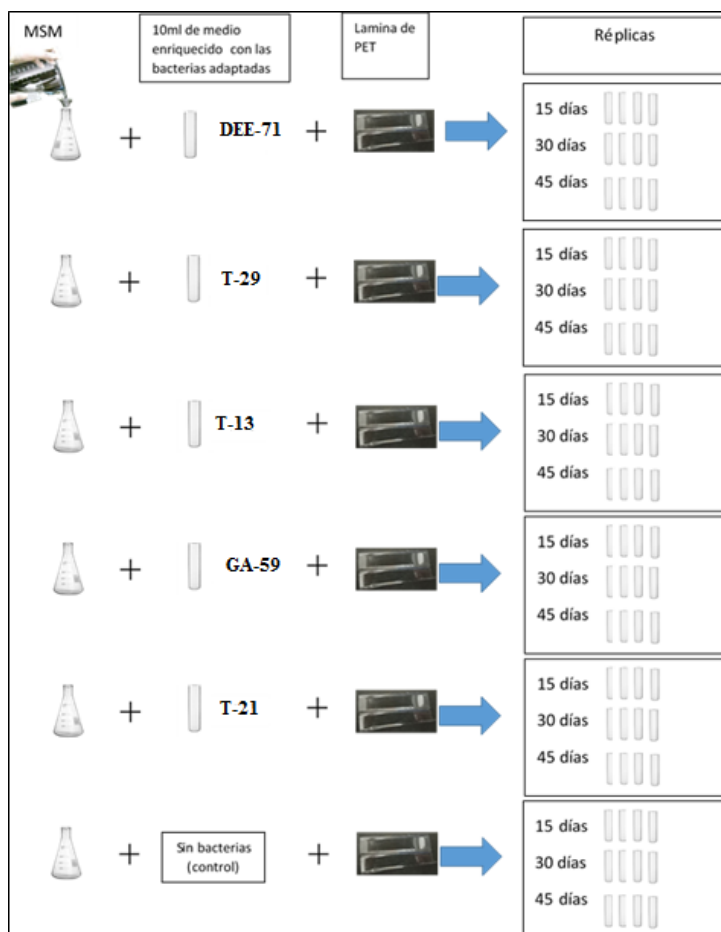


Figura 3. 3. Procedimiento para el proceso de biodegradación de láminas PET.  
Elaborado por: las autoras.

### 3.7.3. FASE III. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN DEL PET EN RELACIÓN A LA PÉRDIDA DE PESO Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MEJORES RESULTADOS ENCONTRADOS

#### 3.7.3.1. ACTIVIDAD 7. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN POR PÉRDIDA DE PESO

Cumplido los diferentes periodos de prueba 15, 30 y 45 días se procedió a la toma de datos, para lo cual se retiraron las láminas de PET del medio mineral esto con ayuda de una pinza, posteriormente se pasaron por un proceso de desinfección retirando el biofilm generado en la superficie del plástico. Se limpió con alcohol al 70% durante 30 minutos, luego por un tiempo de 10 minutos se realizó un lavado con agua destilada y se secaron con papel filtro (Butron, 2020).

Las láminas de los tubos de ensayo controles recibieron el mismo tratamiento de desinfección (Peraza, 2017).

Una vez que las láminas de PET estuvieron completamente secas se procedió a tomar el peso final de cada una, incluyendo las láminas de los controles, esto se realizó mediante el uso de una balanza analítica para evaluar la pérdida de peso con respecto a su peso inicial, posteriormente se realizó el cálculo del porcentaje de biodegradación para ello se utilizó la ecuación [3.2.] (Bermúdez y Sandoval, 2021; Crespo, 2021).

### 3.7.3.2. ACTIVIDAD 8. OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO ÓPTICO

Posterior al proceso de biodegradación al que fueron sometidas las láminas se procedió a su visualización en un microscopio óptico en campo claro y una magnificación de 100X de manera que permita ver algún desgaste o modificación en la estructura de cada lámina de PET (Gómez y Oliveros, 2018).

## 3.8. DISEÑO EXPERIMENTAL

**Tabla 3. 3.** Cepas (tratamientos).

Cepas
DEE-71
T-29
T-13
GA-52
T-21
Control

**Elaborado por:** las autoras.

Se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) unifactorial, donde el único factor fueron las cepas, es decir, 6 tratamientos (considerando el control), 4 repeticiones durante 3 periodos de tiempos diferentes (15, 30 y 45 días). Cabe mencionar que, se consideró importante utilizar las medias de los tratamientos por cada periodo de tiempo, con la finalidad de obtener una mejor exactitud de los datos. El tipo de plástico utilizado se mantuvo constante, al igual que la composición del medio de cultivo.

A continuación, se presenta la tabla del análisis de la varianza correspondiente al DBCA:

Tabla 3. 4. Formato de análisis de la varianza - Diseño de Bloques Completamente al Azar.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F <sub>Calculada</sub>
Tratamientos	$GL_t = t - 1$	$SC_t = \sum_{i=1}^t \frac{Y_i^2}{b} - \frac{Y_{...}^2}{tb}$	$CM_t = \frac{SC_t}{t - 1}$	$F_t = \frac{CM_t}{CM_{Error}}$
Error	$GL_b = b - 1$	$SC_b = \sum_{j=1}^b \frac{Y_j^2}{t} - \frac{Y_{...}^2}{tb}$	$CM_b = \frac{SC_b}{b - 1}$	$F_{Cb} = \frac{CM_b}{CM_{Error}}$
Total	$GL_{Error} = (b - 1)(t - 1)$	$SC_{Error} = SC_{Total} - SC_t - SC_b$	$CM_{Error} = \frac{SC_{Error}}{(b - 1)(t - 1)}$	

t : tratamientos ; b : bloques ; n : total de observaciones (unidad experimental).

Fuente: (Gabriel et al., 2017).

### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Primeramente, se aplicó una transformación a los datos con la finalidad de alcanzar la normalidad y homogeneidad de varianza de la variable respuesta. La ecuación que se empleó fue (Rodríguez y Morales, 2020):

$$y' = \sqrt{y} \quad [3.1.]$$

Ecuación 3. 1. Transformación de raíz cuadrada.

$$y' = \sqrt{y + c} \quad [3.2.]$$

Ecuación 3. 2. Transformación de raíz cuadrada. Estabilización de la varianza de Poisson.

$$y' = \sqrt{y + 1} \quad [3.3.]$$

Ecuación 3. 3. Transformación de raíz cuadrada (Aplicada en el estudio). Estabilización de la varianza de Poisson.

**Donde:**

$y = \%PP$ : Variable respuesta.

$c$  : valor adicional de la raíz cuadrada, como,  $1/10$  (0.1);  $3/8$  (0.375);  $1/2$  (0.5); 1.

$y' = \%PP_{Trans}$  : Variable respuesta transformada [Porcentaje de pérdida de peso (%)].

Por último, se utilizó el programa InfoStat para la determinación de la significancia, la aceptación o el rechazo de las hipótesis (nula y alternativa), mediante el método ANOVA y prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5% (95% de confianza).



## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. FASE I. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS *Bacillus* sp. PRESENTES EN MUESTRAS DE SUELO DE LA ANTÁRTIDA

Se observó que todas mostraron morfología de *Bacillus*; además, presentaron tinción de Gram positivas, endospora central y con forma elipsoidal (Figura 4.1.).

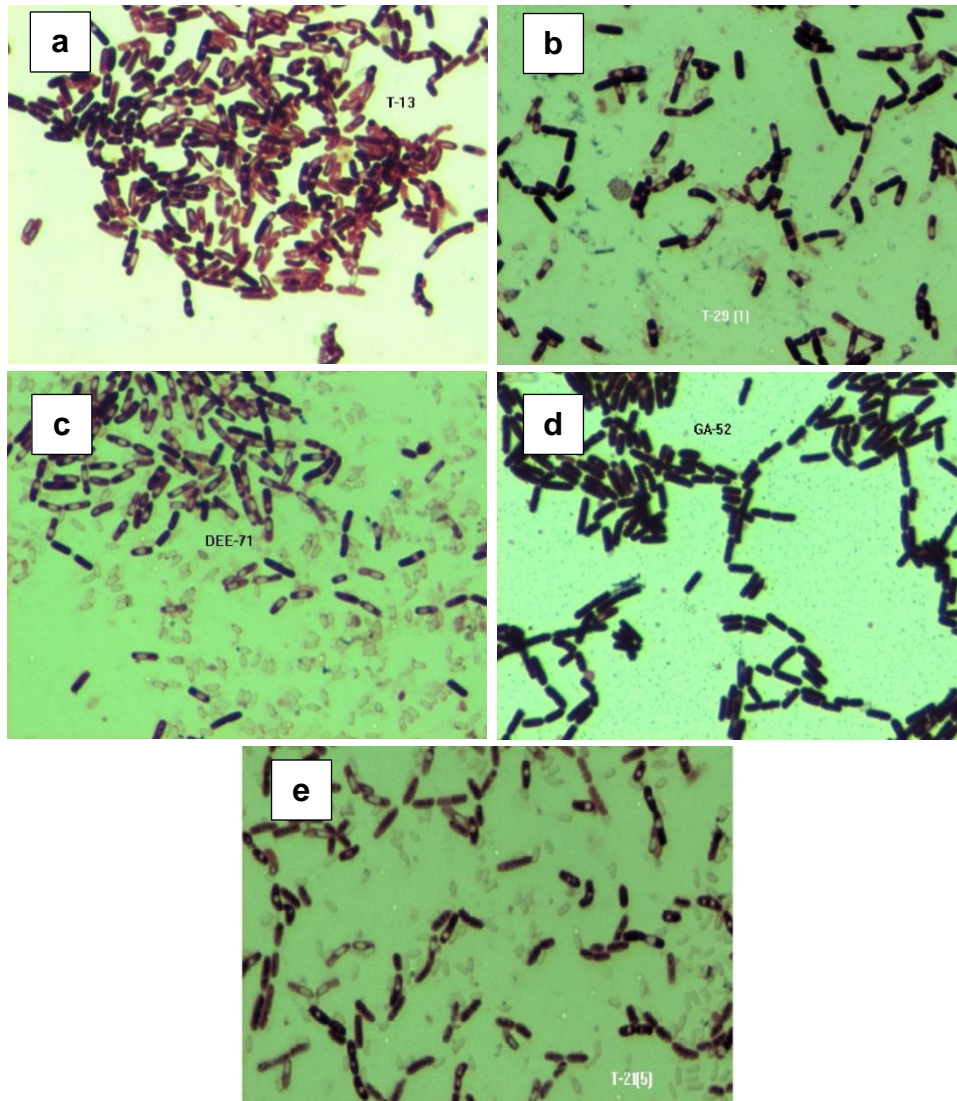


Figura 4. 1. Morfología de *Bacillus* sp.: a) T-13, b) T-29, c) DEE-71, d) GA-52, e) T-21.

Como parte del proyecto de investigación institucional “Bioprospección de microorganismos extremófilos provenientes de muestras de suelo de la Antártida”, se contó con la secuenciación molecular de las 5 cepas, en estudio (Tabla 4.1):

**Tabla 4. 1.** Identificación molecular de las *Bacillus sp.*

<b>CEPAS</b>	<b>ESPECIE</b>
<b>DEE-71</b>	<i>Bacillus paramycoides</i>
<b>T-29</b>	<i>Bacillus paramycoides</i> <i>Bacillus tropicus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i>
<b>T-13</b>	<i>Bacillus anthracis</i>
<b>GA-52</b>	<i>Bacillus wiedmannii</i> <i>Bacillus proteolyticus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus albus</i>
<b>T-21</b>	<i>Bacillus cereus</i>

Elaborado por: las autoras.

El grupo *Bacillus cereus* sensu stricto (s. s.) es un grupo muy diverso, que en realidad está compuesto por ocho especies: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* y *B. toyonensis* (Cardoso, 2019). No obstante, la conformación del grupo *Bacillus cereus* a menudo se modifica y algunas especies nuevas se han propuesto como las mencionadas en este estudio (Tabla 4.2.): *B. wiedmannii* (Maroof et al., 2021), *B. tropicus* (Anitha et al., 2022), *B. albus* (Santos, 2020), *B. proteolyticus* (Cheng et al., 2020; García, 2022), y *B. paramycoides* (Nanthini et al., 2021; Widyananto et al., 2021).

Las cepas aisladas de *Bacillus sp.* fueron diferenciadas de acuerdo a sus características macroscópicas en la formación de colonias, y microscópicas a través de la técnica de tinción de Gram que facilitó su observación bajo el microscopio óptico. A continuación, se presenta la Tabla 4.2. que detalla los resultados obtenidos.

**Tabla 4. 2.** Características Macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas de *Bacillus sp.*

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS					CARACTERÍSTICA MICROSCÓPICAS	
	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	COLOR	GRAM	FORMA
DEE-71	Irregular	Ondulado	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos Estreptobacillus
T-29	Irregular	Ondulado	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos
T-13	Puntiforme	Enteros	Elevada	Suave	Blanco	+	Bacilos Estreptobacillus
GA- 52	Irregular	Ondulado	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos
T-21	Circular	Enteros	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos
	Irregular						

Elaborado por: las autoras.

En las características macroscópicas de las cepas se pudo constatar lo siguiente (Anexo 1.):

- Las cepas DEE-71, T-29, GA-52 y T-21, se identificaron con forma irregular, sin embargo, las cepas T-13 y T-21 se distinguieron por ser puntiforme y circular.
- Se comprobó que las cepas DEE-71, T-29, GA-52, conservaron un borde ondulado, mientras que, las cepas T-13 y T-21 se diferenciaron por poseer bordes enteros.
- Las cepas DEE-71, T-29, GA-52 y T-21 presentaron una elevación plana, en tanto que, la cepa T-13 se caracterizaron con una elevación elevada.
- Todas las cepas demostraron semejanzas con un tipo de superficie suave y un color blanco.

Para Guarderas (2022), las bacterias *Bacillus sp.* muestran una gran variedad entre sus características macroscópicas como su forma, borde y elevación; en cuanto al color se presenta entre crema o blanco, y con superficie suave.

Por otro lado, las características microscópicas detectadas fueron (Anexo 1.):

- Todas las cepas se identificaron como Gram positivas.

- Las cepas DEE-71 y T-13, presentaron formas Bacilos y Estreptobacilus, no obstante, las demás cepas se distinguieron por conservar la forma Bacilos.

El género *Bacillus sp.* generalmente se encuentra por bacilos Gram positivos y su capacidad de producir endosporas (Chiluisa et al., 2020).

## **4.2. FASE II. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE *Bacillus sp.* EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET**

### **4.2.1. ADAPTACIÓN DE *Bacillus sp.* EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET**

En el transcurso del proceso de adaptación de las cinco cepas de *Bacillus sp.* que duró un periodo de 15 días en incubación a 37°C y 150 rpm se visualizaron cambios en el medio de sales minerales que poseía polvo de PET, siendo esta la única fuente de carbono durante esta etapa. A los 4 primeros días se pudo visualizar un ligero aumento en la turbidez del medio de cultivo líquido, lo que de acuerdo a Barona (2021) es un indicativo de desarrollo microbiano en este tipo de medios, coincidiendo con Guerra y Castro (2020) quienes mencionan que la viabilidad de un microorganismo como las bacterias se ve reflejada en la habilidad que estas tienen para multiplicarse y desarrollar características que se pueden visualizar a simple vista, como es formar colonias en medios sólidos o producir turbidez en medios líquidos. Transcurridos 10 días del periodo de adaptación se evidenció la formación de biopelícula, lo que permite constatar macroscópicamente el avance del desarrollo bacteriano en el medio de cultivo utilizado, ver registro de seguimiento (Anexo 2.). Finalizados los 15 días de adaptación, para mayor evidencia se comprobó el crecimiento de las 5 cepas de *Bacillus sp.* mediante la realización de un frotis que posteriormente fue teñido con cristal violeta, observando así la presencia de bacterias en cada uno de los cinco matraces (Anexo 3.).

#### 4.2.2. BIODEGRADACIÓN DE PET POR *Bacillus sp.*

En un tiempo de 45 días se llevó a cabo la observación del proceso de biodegradación en láminas de PET, tomando datos que se registraron en el Anexo 4., evaluando así tres periodos de tiempo comprendidos en 15, 30 y 45 días.

A continuación, se presentan los resultados observados mediante tablas de caracterización macroscópica, que muestran el crecimiento bacteriano en los periodos mencionados:

**Tabla 4. 3.** Caracterización macroscópica en MSM.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS A LOS 15 DÍAS			
	BIOPELÍCULA	SEDIMENTO		TURBIDEZ EN AGITACIÓN
		CANTIDAD	CONSISTENCIA	
DEE-71	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
T-29	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
T-13	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
GA- 52	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
Control	-	Escaso	Granular	-

**Elaborado por:** las autoras.

En la tabla 4.3. se muestra un mismo patrón de caracterización macroscópica observada en el medio de sales minerales donde se desarrollaron las bacterias, a los 15 días las réplicas de las 5 bacterias en estudio mostraron una ligera turbidez que en reposo se volvió casi nula dado que se precipitaron sedimentos de características granulares blanco y escaso, lo que concuerda con el estudio de Espinoza (2018) quien menciona que a los 15 primeros días se puede destacar una ligera sedimentación en todas las muestras, posiblemente debido a la baja agitación que precipitó las sales minerales del medio utilizado.

Así también se formó una biopelícula no tan pronunciada de aspecto membranosa que en parte coincide con Arotoma y Apaclla (2021); Uribe et al. (2013) quienes observaron la aparición de biopelículas muy ligeras en el desarrollo de sus ensayos con polietileno de baja densidad, esto como evidencia de un ataque microbiano, Álvarez et al. (2018) obtuvo los mismos resultados dado que sus muestras presentaron una escasa notoriedad de la biopelícula.

El medio de cultivo del control se mantuvo con características completamente transparentes en reposo. Las láminas de PET no mostraron cambios notorios a simple vista.

**Tabla 4. 4.** Caracterización macroscópica en MSM.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS A LOS 30 y 45 DÍAS			
	BIOPELÍCULA	SEDIMENTO		TURBIDEZ EN AGITACIÓN
		CANTIDAD	CONSISTENCIA	
DEE-71	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
T-29	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
T-13	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
GA- 52	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
T-21	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
Control	-	Escaso	Granular	-

Elaborado por: las autoras.

La tabla 4.4. muestra que a los 30 y 45 días no hubo mayor variación en ambos periodos de tiempo. Se mantuvo una ligera turbidez en todas las réplicas que fueron inoculadas con *Bacillus sp.*, sin embargo, en estado de reposo la turbidez fue mayor que en el periodo de los 15 días. El sedimento tuvo un cambio en la consistencia siendo este grumoso y abundante con una coloración cremosa, lo que tiene relación a lo expuesto por Crespo (2021) quien observó en su investigación, el crecimiento de bacterias en las muestras de polietileno de baja y alta densidad con aspecto similar al requesón. El género *Bacillus sp.* muestra una variedad de morfologías que son visualizadas de manera macroscópica y que varían de acuerdo a la especie y el medio de cultivo, incluyendo colonias de apariencias grumosas o arrugadas (Palafox, 2019). La biopelícula se conservó membranosa pero también se visualizó la ligera formación de un anillo alrededor de los tubos de ensayo. El control se mantuvo constante.

Las láminas de PET reflejaron adherencias con una coloración cremosa en la mayor parte de la superficie, no se observó el mismo brillo que las láminas presentaron en un inicio del experimento estas se visualizaban ligeramente opacas a diferencia del control que mantuvo un aspecto transparente del medio de cultivo y sin adherencias en la lámina. Lo descrito es viable a lo publicado por otros autores que realizaron investigaciones similares donde mencionan que las bacterias y los hongos pueden adherirse a las superficies sólidas utilizando una

serie de factores físicos, incluidas las fuerzas que les ayudan a adherirse a la superficie, las características de la superficie y la naturaleza del microorganismo (Maheswaran et al., 2022).

Los microorganismos que pueden adherirse a la superficie pueden crecer utilizando polímeros como fuente de carbono, esto se debe a que las bacterias se encuentran en un estado de falta de fuentes nutricionales, por lo que utilizan el plástico como fuente de nutrición para apoyar su crecimiento (Septia et al., 2020).

Así también mencionan que en la biodegradación del polietileno se pueden generar parámetros visuales como cambios en la opacidad del material o la formación de biopelícula, esto como un indicio de algún tipo de degradación (Gómez, 2021).

Las bacterias que más frecuentemente forman biopelículas en la superficie del polietileno pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Bacillus* (Montazer et al., 2020).

### 4.3. FASE III. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN DEL PET EN RELACIÓN A LA PÉRDIDA DE PESO Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MEJORES RESULTADOS ENCONTRADOS

#### 4.3.1. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN POR PÉRDIDA DE PESO

La biodegradación de las láminas de PET se comprobó mediante la cuantificación de la pérdida de peso y se validó consecutivamente mediante la observación microscópica y análisis estadístico.

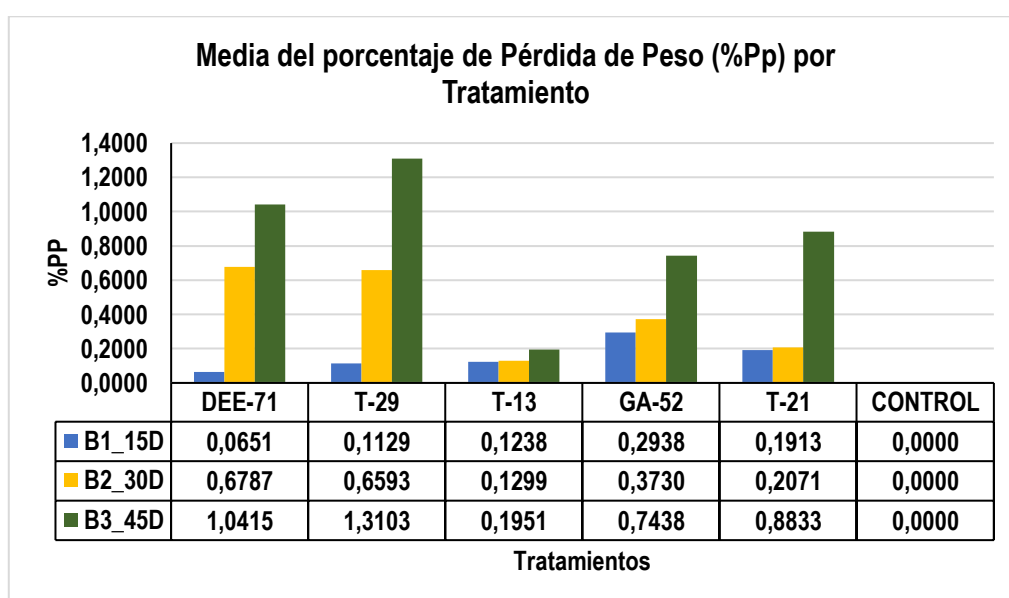


Gráfico 4. 1. Media del porcentaje de Pérdida de Peso (%Pp) por Tratamiento.

En la gráfica 4.1. (Anexo 5. y Anexo 6.), se analizó la capacidad biodegradadora en función de los tres diferentes periodos de tiempo (15, 30 y 45 días). Donde presentó la disminución del peso de las láminas de PET (diferencia entre el peso promedio inicial y final) y porcentaje de pérdida de peso.

Transcurridos 15 días, existió un reducido porcentaje de pérdida de peso promedio donde predominó *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus albus* (0.2938%); seguido de *Bacillus cereus* (0.1913%); *Bacillus anthracis* (0.1238%); *Bacillus paramycoides*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (0.1129%); y *Bacillus paramycoides* (0.0651%).



A los 30 días, se comprobó un superior porcentaje de pérdida de peso promedio representado por *Bacillus paramycoides* (0.6787%); continuando con *Bacillus paramycoides*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (0.6593%); *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus cereus* y *Bacillus albus* (0.3730%); *Bacillus cereus* (0.2071%); y *Bacillus anthracis* (0.1299%).

Posteriormente, a los 45 días T-29 (1.3103%) presentó el mayor porcentaje de biodegradabilidad promedio, luego DEE-71 (1.0415%), T-21 (0.8833%), GA-52 (0.7438%) y T-13 (0.1951%).

En el control, no se detectó ningún cambio en cuanto a la disminución de peso en el curso de los 15, 30 y 45 días.

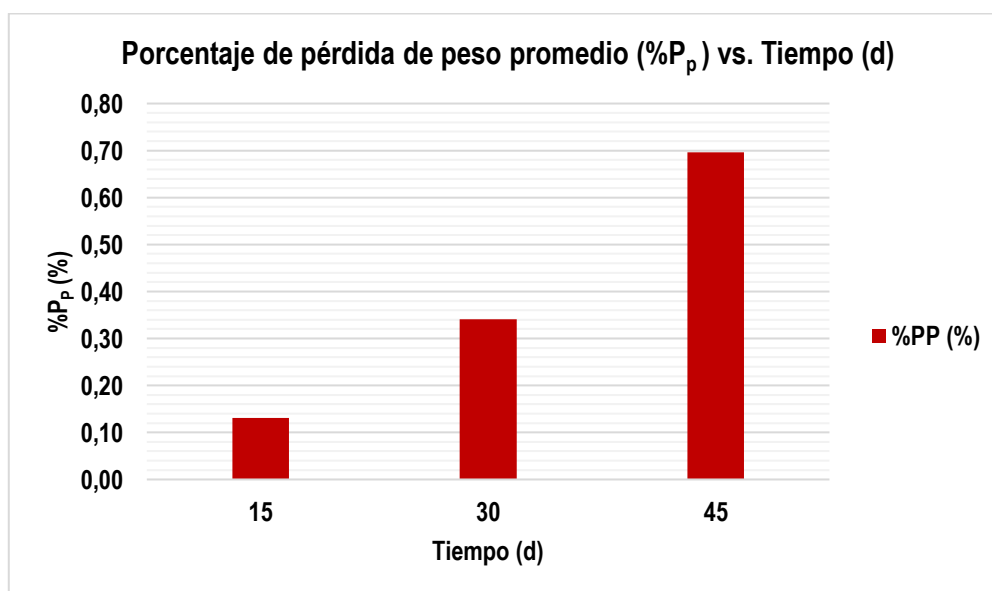
Para Arefian et al. (2020), los primeros días de evaluación se consideran como el resultado de adaptabilidad frente al entorno de eliminación del plástico. Por otro lado, bajo condiciones de estrés las bacterias liberan enzimas nuevas y necesarias para efectuar el proceso de biodegradación del PET (Boll et al., 2020; González-Márquez et al., 2021; Ren et al., 2019).

Sin embargo, la mayoría de estas enzimas son capaces de degradar PET, tanto a elevadas temperaturas (50 – 70 °C) (Puspitasari et al., 2021), como a temperatura ambiente, con la diferencia que la actividad degradativa es muy baja (Qi et al., 2021).

Diversos estudios sobre biodegradación del PET han reportado especies bacterianas con capacidad enzimática para degradar el PET, como *Bacillus sp.* y específicamente el grupo *Bacillus cereus* sensu estricto (s. s.) (Papadopoulou et al., 2019; Roager y Sonnenschein, 2019; Taghavi, 2021; Torena et al., 2021).

Las especies que se presentaron en este estudio tienen antecedentes de degradación microbiana en diferentes tipos de plásticos, como: *B. cereus* con polietileno lineal de baja densidad (PELBD o LLDPE) (6%) y polietileno de alta densidad (PEAD o HDPE) 8% en 90 días; *B. anthracis* en polietileno de baja densidad (PEBD o LDPE) con un 7.23% en el transcurso de 30 días (Fibriarti et al., 2021); *B. wiedmannii* con PEBD 5.39% en 90 días (Maroof et al., 2021); *B. tropicus* en PEBD con un 10.15% durante 40 días (Samanta et al., 2020); *B.*

*albus* en PET (2%) por 40 días (Roberts et al., 2020) ; *B. proteolyticus* (Cheng et al., 2020; García, 2022); y *B. paramycooides* en polietileno (PE) (2%), polipropileno (PP) (1.75%) y poliestireno (PS) (11.12%) en el curso de 42 días (Pikoli et al., 2022). Es necesario señalar que, la disminución progresiva del peso molecular de estos polímeros dependerá del pretratamiento (Villafañe, 2018).



**Gráfico 4. 2.** Porcentaje de pérdida de peso promedio (%Pp) y los periodos de tiempo de evaluación (15, 30 y 45 días).

El gráfico 4.2. (Anexo 6.), simplifica estos resultados dado que las pérdidas de peso porcentuales promedio fueron 0.13%, 0.34% y 0.69% a los 15, 30 y 45 días, respectivamente. Existe similitud con otro estudio, donde se obtuvo porcentajes de pérdida de peso promedio parecidos como: 0.03%, 0.21%, 0.29%, 0.75%, 1.26%, 0.96%, con un periodo de evaluación de cada 15 días por 3 meses (15, 30, 45, 60, 75 y 90 días) (Kumari et al., 2019).

#### **4.3.2. OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO ÓPTICO**

La visualización por microscopio óptico se realizó a partir de la tinción de las láminas con cristal violeta con el fin de tener una mayor apreciación de los cambios generados en el PET. Las láminas bajo el microscopio presentaron una apariencia desgastada, con grietas y surcos similares a rayones como se muestra (Anexo 7.), lo que puede ser un indicio de algún ataque por parte de las bacterias, dado que la visualización de una lámina que no fue sometida a

tratamiento no mostró estas características, lo que dificultó la observación, por su transparencia y superficie lisa. Asimismo, se observaron restos de la biopelícula adherida al plástico y pequeños fragmentos de PET (Anexo 8.).

Los métodos de biodegradación utilizados por otros autores como Denaro et al. (2020) muestran que el PET sometido a la presencia de cultivos de enriquecimiento con bacterias tenía forma muy irregular con pequeñas grietas, surcos y cavidades, que probablemente eran resultado de la actividad microbiana. Coincidiendo con Arias (2018) que menciona haber tenido cambios notorios observados en la superficie del material plástico, tales como grietas, que señala ser una evidencia de degradación.

La degradación se puede evidenciar en los cambios que se presentan en las propiedades de los materiales plásticos; a partir del desgaste o erosión, la pérdida de brillo superficial y de las propiedades mecánicas como dureza y flexión (Loaiza, 2022).

#### 4.3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE BIODEGRADABILIDAD

Seguidamente, se efectuó el análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para la caracterización de las diferencias significativas presentadas.

Asimismo, cuando los datos de las medias son próximos a cero, el valor del coeficiente de variación tiende a elevarse (Lohr, 2021). Por tal motivo, se realizó una transformación de datos (Ecuación 3.3.) hacia la variable respuesta (porcentaje de pérdida de peso promedio). Cabe recalcar que, este último resultado (%P<sub>P\_Trans</sub>) se obtuvo con la finalidad de reducir el coeficiente de variación y conservar una distribución normal de los datos.

**Tabla 4. 5.** Resumen del análisis de varianza (ANOVA).

Factores	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F <sub>Calculada</sub>	F <sub>Tabla</sub>	p-valor
Tratamientos	0.18	5	0.04	3.50	3.33	0.0436
Bloques	0.16	2	0.08	7.46	4.10	0.0104
Error	0.10	10	0.01			
Total	0.44	17				

Elaborado por: las autoras.

En la tabla 4.5. (Anexo 9.), se evidenció que entre los tratamientos los porcentajes de pérdida de peso promedios fueron similares, es decir, no existió diferencia significativa. Ríos (2022) menciona que, existe una dominante semejanza a secuencias de nucleótidos pertenecientes a genomas del grupo *Bacillus cereus* sensu estricto (s. s.), conforme con los ensayos de observación morfológica y bioquímicas. Por lo que, coincide con los resultados del presente estudio entre tratamientos conformados por el mismo grupo *Bacillus cereus*.

Sin embargo, en los bloques se mostraron dos grupos (A y B) (Anexo 10.), donde el que destacó fue el bloque tres a los 45 días (B3\_45D), mientras que, el bloque uno a los 15 días (B1\_15D) fue el que menor representatividad tuvo. Por lo tanto, existe diferencia estadística y se acepta la hipótesis alternativa ( $p$ -valor  $< 0.05$ ). Contreras y Cubas (2020), llegaron a la resolución de que los periodos de incubación y/o evaluación no se interrelacionan con la pérdida de peso, sin embargo, afirman que el grupo *B. cereus* posee capacidad biodegradadora de PS, PE, PVC y PET.

Del mismo modo, se presentó un coeficiente de variación (C.V.) del 8.75 %, donde se ratificó la homogeneidad de los datos. Moscote y Quintana (2018) señalan que, si el C.V.  $< 0.15$  (15%) la dispersión es muy reducida. Asimismo, Sucasaire (2021) indica que, si el C.V.  $< 0.30$  (30%) la (s) media (s) es representativa y se muestra homogeneidad en los datos.

# CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1. CONCLUSIONES

- Se identificaron las 5 cepas seleccionadas del género *Bacillus sp.* de la expedición realizada en el 2014 a la Antártida, cultivándolas en Agar nutritivo presentando un crecimiento óptimo, clasificándolas como bacterias Gram positivas observando la presencia de endosporas central, con forma elipsoidal resultado de la tinción Gram.
- De acuerdo al tiempo de adaptación de las bacterias se visualizó cambios en el medio de sales minerales y en la lámina de PET como única fuente de carbono. En los periodos de evaluación determinados existió aumento en la turbidez del MSM, formación de biopelícula y cambios estructurales en el PET.
- Las cepas representativas con mayor porcentaje de biodegradación fueron T-29 (1.31%) y DEE-71 (1.04%), en el periodo de 45 días. Evidenciando que la degradación de plástico se ve fuertemente vinculada a cambios en la superficie de sus polímeros, como grietas, porosidades, pero especialmente formación de biofilms; mostrando la generación de productos enzimáticos en la superficie del plástico, pudiendo estas bacterias ser utilizadas a futuro como una estrategia en la reducción de microplástico.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Identificar el rol de estas cepas a través de ingeniería genética para evaluar las enzimas que intervienen en la degradación de PET a objetivos de futuras investigaciones.
- Evaluar resultados a partir de diferentes tipos de pH (5 y 6) y diferentes temperaturas, para comprobar las condiciones de crecimiento óptimo de las bacterias.
- Es importante manejar un mismo peso inicial de las láminas de PET, con la finalidad de no obtener variación notoria entre los datos, ante la

aplicación de los análisis estadísticos, puesto que al no existir homogeneidad la variación aumentará considerablemente.

- Considerar la aplicación de otros pretratamientos físicos a las láminas de PET para facilitar el proceso de biodegradación al ser sometidas a los microorganismos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aldaz, F. (2019). *Depolimerización de PET (tereftalato de polietileno) mediante bloqueo de escisión de cadena polimérica como alternativa para su reciclaje químico*. Universidad Católica del Ecuador.
- Altieri, L. (2020). *Microplásticos como vectores de transmisión de bacterias resistentes a antibióticos en sistemas acuáticos* (pp. 1–34).
- Álvarez, A. (2020). Clasificación de las investigaciones. *Universidad de Lima*, 4. <https://core.ac.uk/download/pdf/322967825.pdf>
- Álvarez, J., Beltrán, M., Vásquez, A., Gutiérrez, M. y Enríquez, M. (2018). *Formación de biopelícula sobre plásticos degradables en ambientes marinos*.
- American Society for Testing and Materials [ASTM]. (2018). *Section 4 Construction*.
- Andrade, M. y Vélez, P. (2017). *Manejo de residuos plásticos en las carreras de medio ambiente y agroindustria de la ESPAM "MFL"*. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López" (ESPAM MFL).
- Anitha, R., Maruthi, R. y Sudha, S. (2022). Automated segregation and microbial degradation of plastic wastes: A greener solution to waste management problems. *Global Transitions Proceedings*, 3(1), 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.gltp.2022.04.021>
- Aravena, R., Contreras, N., Herrera, R., Infante, J., Del Valle, D., Marín, D. y Muñoz, C. (2017). *Microscopía óptica y lupa*.
- Arefian, M., Tahmourespour, A. y Zia, M. (2020). Polycarbonate biodegradation by newly isolated *Bacillus* strains. *Archives of Environmental Protection*, 46(1), 14–20. <https://doi.org/10.24425/aep.2020.132521>
- Arias, C. y Vásquez, A. (2018). Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables de mayor uso en Colombia. En *Universidad*

*Autónoma Metropolitana. Universidad Autónoma Metropolitana.*

Arotoma, F. y Apacclla, A. (2021). *Biodegradación del polietileno de baja densidad (LPDE) con Staphylococcus sp aislado del botadero de Ascensión - Huancavelica.*

Asociación Ecuatoriana de Plásticos [ASEPLAS]. (2020). Economía circular, más allá de residuos y reciclaje. *Revista Integra Edición 64*, 1–44.

Atanasova, N., Stoitsova, S., Paunova-krasteva, T. y Kambourova, M. (2021). Plastic degradation by extremophilic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115610>

Ávila, S. y Morán, H. (2021). *Estudio comparativo de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos como es Aspergillus y Penicillium.*

Barbarán, H., Cabanillas, L. y Rubio, Y. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de Pseudomona aeruginosa, en condiciones de laboratorio.* Universidad César Vallejo (UCV).

Barona, M. (2021). *Introducción a la Microbiología.*

Bastidas, Y. y Vaca, J. (2018). *Caracterización de microorganismos con actividad antimicrobiana provenientes de suelos de los cantones Quito y Rumiñahui.*

Bermúdez, D. (2021). *Evaluación de microorganismos (Trichoderma spp. y Pseudomona aeruginosa) para la degradación del PET.* Universidad de América (Colombia).

Bermúdez, D. y Sandoval, J. (2021). *Degradación del polietileno tereftalato por medio de microorganismos.*

Boll, M., Geiger, R., Junghare, M. y Schink, B. (2020). Microbial degradation of phthalates: biochemistry and environmental implications. *Environmental Microbiology Reports*, 12(1), 3–15. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12787>

Butron, S. (2020). Capacidad de Biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa*



frente al polietileno de baja densidad. *Revista De Investigaciones De La Escuela De Posgrado*, 9(3), 1671–1684.

Caicedo, S. y Chacón, J. (2017). *Pruebas bajo invernadero de cepas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp. en Brassica oleracea var italica y técnicas de conservación de cepas*. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.

Calcetero, L. y Mancera, J. (2021). *Evaluación del proceso de colonización y degradación de polietileno de baja densidad por inóculo de Aspergillus niger en humus y compostaje doméstico*.

Cano, A. (2021). *¿Qué es el microscopio y para qué sirve?* Cultura y Ciencia. <https://culturayciencia.diariocronicas.com/microscopio-optico-para-que-sirve/>

Cardoso, P. de F. (2019). Diversity and functional analysis of Rap-Phr systems from Bacillus cereus group. En *Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil)*.

Castañeta, G., Gutiérrez, A. F., Nacaratte, F. y Manzano, C. A. (2020). Microplásticos: un contaminante que crece en todas las esferas ambientales, sus características y posibles riesgos para la salud pública por exposición. *Revista Boliviana de Química*, 37(3). <https://doi.org/10.34098/2078-3949.37.3.4>

Checa, A. (2018). *Método: Medios de cultivo sólidos agar o agarosa*.

Cheng, C., Shang-Guan, W., He, L. y Sheng, X. (2020). Effect of Exopolysaccharide-Producing Bacteria on Water-Stable Macro-Aggregate Formation in Soil. *Geomicrobiology Journal*, 37(8), 738–745. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1764677>

Chero, A. (2019). *Clasificación de medios de cultivo más usados en Microbiología*.

Chiluisa, V., Campaña, M. y Acurio, R. (2020). Determinación microbiológica y

molecular mediante PCR en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus* de interés agrobiotecnológico. *Bionatura*, 5(2), 1106–1110. <https://doi.org/10.21931/rb/2020.05.02.4>

Chunga, L. y Cieza, C. (2017). *Biodegradación de poliestireno utilizando microorganismos presentes en el humus de lombriz durante los meses, octubre – diciembre 2016*. Universidad de Lambayeque (Perú).

Cobo, C. (2017). *Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis**.

Collaguazo, L. y Tenorio, E. (2018). *Elaboración de biopreparados a base de *Bacillus* sp. para controlar *Alternaria* spp. en el cultivo de *Brassica oleracea* var. *italica**. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito.

Constitución de la República del Ecuador. (2008). *Constitución de la República del Ecuador*.

Contreras, S. y Cubas, M. (2020). *Biotecnologías bacterianas para la biodegradación de polímeros. Una revisión sistemática y metaanálisis, 2020*. Universidad César Vallejo.

Crespo, A. (2021). *Biodegradación de partículas de microplástico de polietileno a partir de un consorcio microbiano aislado del contenido intestinal de la larva *Galleria mellonella* L.*

Denaro, R., Aulenta, F., Crisafi, F., Di Pippo, F., Cruz Viggi, C., Matturro, B., Tomei, P., Smedile, F., Martinelli, A., Di Lisio, V., Venezia, C. y Rossetti, S. (2020). Marine hydrocarbon-degrading bacteria breakdown poly(ethylene terephthalate) (PET). *Science of the Total Environment*, 749. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141608>

Espinoza, L. (2018). *Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos*. Universidad San Francisco de Quito (USFQ).

Farzi, A., Dehnad, A. y Fotouhi, A. (2019). Biodegradation of polyethylene

terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17(1), 25–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.002>

Fernández, C. (2021). *Análisis de la capacidad de formación de biofilms en Salmonella Typhimurium* (pp. 1–27).

Fibriarti, B. L., Feliatra, Amin, B. y Darwis. (2021). Biodegradation of LDPE plastic by local strain of *Bacillus* sp. Isolated from dump soil of Pekanbaru, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(12), 5484–5490. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d221232>

Flashman, E. (2018). *Cómo funcionan realmente las bacterias que comen plástico*.

Gabriel, J., Castro, C., Valverde, A. y Indacochea, B. (2017). *Diseños experimentales: Teoría y práctica para experimentos agropecuarios*. Universidad Estatal del Sur de Manabí (UNESUM).

Gamarra, M. (2020). *Determinación de temperatura y pH para la optimización de la actividad proteolítica alcalina de Bacillus sp. aislados de tierras de cultivo de Zea mays*.

García, R. (2021). *Los envases PET: características y reciclaje*. Envases de plástico Rosa S.A. <https://rosaenvases.com/blog/los-envases-pet/>

García, S. (2022). *Efecto de los microorganismos en la remediación de suelos agrícolas en Tumilaca – Región de Moquegua*. Universidad José Carlos Mariátegui.

Gómez, J. y Oliveros, C. (2018). *Biodegradación de polietileno de tereftalato por microorganismos aislados de sitios de disposición final de residuos sólidos, Táchira, Venezuela*.

Gómez, M. (2021). *Degradación del polietileno por actinobacterias*. Pontificia Universidad Javeriana.

- González, V. (2019). *Capacidad biodegradativa de hongos filamentosos frente al polietileno*. Universidad Nacional del Altiplano.
- González-Márquez, A., Volke-Sepulveda, T., Díaz, R. y Sánchez, C. (2021). Enhanced esterase activity during the degradation of dibutyl phthalate by *Fusarium* species in liquid fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(9–10), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab062>
- Google Earth. (2018). *Laboratorio de Biología Molecular - ESPAM MFL*.
- Guarderas, D. (2022). Antagonismo in vitro de bacterias y hongos endófitos y de la rizosfera de banano contra *Fusarium oxysporum*. En *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Guerra, M. y Castro, J. (2020). Evaluación de viabilidad de microorganismos. *Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*.
- Hernández, E., Camacho, S. y Contreras, C. (2020). Conocimiento sobre la técnica de fijación de muestras anatomopatológicas, por parte del personal que labora en una Institución prestadora de servicios de salud, Hospital De San José. En *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Hernández, L. y Martín, N. (2021). *Determinación de la capacidad de degradación del policloruro de vinilo (PVC) por bacterias aisladas de un suelo*. Universidad Libre.
- Herrera, R. y Ospina, D. (2019). Propuesta de un proceso para el tratamiento biológico del PEBD utilizando bacterias u hongos, a partir de una revisión sistemática. En *Universidad del bosque*. Universidad El Bosque.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC]. (2020). Índice de Producción de la Industria Manufacturera. En *Boletín Técnico - N° 08-2020-IPI-M*.
- Isac, L. (2018). Capítulo 2. El Microscopio Óptico. En *Revista de Actualización Clínica Investiga*.

- Kumari, A., Chaudhary, D. R. y Jha, B. (2019). Destabilization of polyethylene and polyvinylchloride structure by marine bacterial strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1507–1516. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3465-1>
- Lavayen, K. (2021). *El microplástico y la contaminación del mar*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Guayaquil- Ecuador.
- Libera. (2019). Impacto del abandono del plástico en la naturaleza. En *Ecoembes*.
- Loaiza, D. S. (2022). *Análisis de la aplicación de microorganismos para la degradación de plásticos*.
- Lohr, S. (2021). *Sampling: Design and Analysis (Advanced Series) 3rd Edition*. Chapman & Hall.
- López, J., Pomaquero, J. y López Salazar, J. (2020). Análisis de la contaminación ambiental por plásticos. *Polo del Conocimiento*, 5(12), 725–742. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i12.2139>
- Luna, Á. (2020). *La era del plástico: Una nueva amenaza para la conservación de la naturaleza* (Editorial).
- Maheswaran, M., Al-Ansari, M., Al-Humaid, L., Raj, J. S., Woong, K., Natchimuthu, K. y Kasim, M. R. (2022). *In vivo degradation of polyethylene terephthalate using microbial isolates from plastic polluted environment*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136757>
- Maroof, L., Khan, I., Yoo, H. S., Kim, S., Park, H. T., Ahmad, B. y Azam, S. (2021). Identification and characterization of low density polyethylenedegrading bacteria isolated from soils of waste disposal sites. *Environmental Engineering Research*, 26(3), 0–2. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.167>
- Martínez, V. (2017). *Estudio de la degradabilidad del PET (polietilen tereftalato) dosificado con un biopolímero de la fibra de banano*. Universidad Politécnica Salesiana.

- Mayhuire, E., Cuadros, Y., Zanardi, L. y Medina De Miranda, E. (2019). Biopelículas producidas con cáscara de naranja y reforzadas con celulosa bacteriana. *Rev Soc Quím Perú*, 85(2), 231–241.
- Mena, M. (2021). *La producción de plásticos en el mundo*.
- Mendoza, S. (2020). Aplicaciones del proceso sellado en la industria de confecciones de plástico. En *Pontificia Universidad Católica del Perú*. Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP).
- Meza, M. (2013). Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballa y gallina. En *Escuela Politécnica del Ejército*.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG]. (2018). *Sistema Nacional de Información y Gestión de Tierras Rurales e Infraestructura Tecnológica (SIGTIERRAS)*.
- Montazer, Z., Najafi, M. B. H. y Levin, D. B. (2020). *Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene*. <https://doi.org/10.3390/polym12010123>
- Moreno, L. (2017). *Caracterización de cepas bacterianas de la laguna amarilla perteneciente al nevado El Altar en la provincia de Chimborazo*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Moscote, O. y Quintana, L. (2018). Estadística I. En *Escuela Superior De Administración Pública* (pp. 1–108).
- Nanthini, K., Raju, P., Santhanam, P., Dinesh, S., Krishnaveni, N., Roopavathy, J. y Perumal, P. (2021). Biodegradation of low-density polyethylene and polypropylene by microbes isolated from Vaigai River, Madurai, India. *Archives of Microbiology*, 203, 6253–6265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00203-021-02592-0>
- Ormaza, J., Neira, M., Giler, L. y Quevedo, J. (2020). Máquina bio-recicladora de plástico pet: un emprendimiento viable. Caso Azogues – Ecuador. *Telos*

*Revista de Estudios Interdisciplinarios en Ciencias Sociales*, 22(2), 395–409. <https://doi.org/10.36390/telos222.11>

Palacios, C. y Prado, V. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato por acción de consorcios bacterianos procedentes de diferentes tipos de humus*.

Palafox, S. (2019). *Caracterización de bacterias del género Bacillus aisladas de suelos de milpa del alto mezquital hidalgo con capacidad antagónica contra fusarium tesis*.

Palma, H. y Tenesaca, F. (2020). Estudio de la degradabilidad del PET (Polietileno Tereftalato) dosificado con celulosa de la cáscara de cacao. En *Universidad Politécnica Salesiana*.

Papadopoulou, A., Hecht, K. y Buller, R. (2019). Enzymatic PET degradation. *Chimia*, 73(9), 743–749. <https://doi.org/10.2533/chimia.2019.743>

Peraza, A. (2017). *Estudio preliminar de la biodegradación de plásticos por bacterias marinas*.

Pérez, J. (2020). Biodegradación de tereftalato de polietileno: microorganismos, enzimas y perspectivas futuras. En *Universidad de la Laguna* (Vol. 1, Número 1).

Picó, Y. y Barceló, D. (2019). Analysis and prevention of microplastics pollution in water: Current perspectives and future directions. *ACS Omega*, 4(4), 6709–6719. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00222>

Pikoli, M. R., Astuti, P., Rahmah, F. A., Sari, A. F. y Solihat, N. A. (2022). Biodegradation of Microplastics by Microorganisms Isolated from Two Mature Landfill Leachates. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2022.005>

Plastics Europe. (2020). Plásticos – Situación en 2020. En *Plastics Europe*.

Plaza, J. (2019). *Degradación de celulosa de pañales desechables usados con Bacillus sp.*

- Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA]. (2018). *Plásticos de un solo uso: una hoja de ruta para la sostenibilidad*. <https://www.unep.org/es/resources/informe/plasticos-de-un-solo-uso-una- hoja-de-ruta-para-la-sostenibilidad>
- Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA]. (2019). *Reciclaje de plástico: el sector está listo para un nuevo impulso*. <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/reciclaje-de- plastico-el-sector-esta-listo-para-un-nuevo-impulso>
- Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA]. (2021). *Políticas, regulaciones y estrategias en América latina y el Caribe para prevenir la basura marina y los residuos plásticos*.
- Puspitasari, N., Tsai, S. L. y Lee, C. K. (2021). Fungal Hydrophobin RoIA Enhanced PETase Hydrolysis of Polyethylene Terephthalate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), 1284–1295. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03358-y>
- Qi, X., Ma, Y., Chang, H., Li, B., Ding, M. y Yuan, Y. (2021). Evaluation of PET Degradation Using Artificial Microbial Consortia. *Frontiers in Microbiology*, 12(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.778828>
- Ramos, M. (2019). *Enriquecimiento de bacterias psicrófilas fijadoras de nitrógeno en reactores biológicos secuenciales (SBR)*.
- Ren, L., Men, L., Zhang, Z., Guan, F., Tian, J., Wang, B., Wang, J., Zhang, Y. y Zhang, W. (2019). Biodegradation of polyethylene by enterobacter sp. D1 from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(1941), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111941>
- Ríos, Á. (2022). Aislamiento, identificación y caracterización fisiológica de bacterias del género *Bacillus* (Christian Gottfried Ehrenberg, 1835) productoras de polihidroxicanoatos. En *Universidad Autónoma de Nuevo León*.



- Rivas, J. (2020). Capacidad biodegradativa de la cucaracha *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) sobre la bolsa plástica y el film para la elaboración de abono. En *Universidad Nacional Agraria de la Selva*.
- Rivas, M. y Garelli, O. (2021). *Impacto de la contaminación por plásticos en la biodiversidad y patrimonio biocultural de México*. Heinrich Böll Stiftung. <https://rolleat.com/es/impacto-ambiental-del-plastico/>
- Roager, L. y Sonnenschein, E. C. (2019). Bacterial Candidates for Colonization and Degradation of Marine Plastic Debris. *Environmental Science and Technology*, 53(20), 11636–11643. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02212>
- Roberts, C., Edwards, S., Vague, M., León-Zayas, R., Scheffer, H., Chan, G., Swartz, N. A. y Mellies, J. L. (2020). Environmental Consortium Containing *Pseudomonas* and *Bacillus* Species Synergistically Degrades Polyethylene Terephthalate Plastic. *mSphere*, 5(6), 1–20. <https://doi.org/10.1128/msphere.01151-20>
- Rocha, J. y Peña, D. (2020). *Biodegradación de Tereftalato de Polietileno (PET)*.
- Rodríguez, C. y Zhurbenko, R. (2018). *Manual de medios de cultivo*.
- Rodríguez, H. (2019). La degradación del plástico potencia el efecto invernadero. *National Geographic España*.
- Rodríguez, O. y Morales, S. (2020). *Tema 7. Transformación de datos*. <https://www.youtube.com/watch?v=tzbVSgynGBM>
- Rodriguez, P. y Arenas, R. (2018). *Hans Christian Gram y su tinción*.
- Samanta, S., Datta, D. y Halder, G. (2020). Biodegradation efficacy of soil inherent novel sp. *Bacillus tropicus* (MK318648) onto low density polyethylene matrix. *Journal of Polymer Research*, 27(10), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02296-x>
- Santos, K. (2020). *Evaluación de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas a partir de un contenedor de aceite usado de motor*. Universidad

Técnica del Norte.

Secretaría Nacional de Planificación. (2021). Plan de Creación de Oportunidades 2021-2025. En *Gobierno del Encuentro*.

Septia, C., Miftahul, J., Asiska, P. y Akmal, D. (2020). *Polyethylene Terephthalate Plastic Degradation Using Soil Bacteria from Mount Jayawijaya, Papua, Indonesia*. <https://doi.org/10.9790/2380-1301040108>

Silva, E. (2020). *Caracterización de cepas bacterianas psicrófilas de los glaciares tropicales en el volcán Chimborazo*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Soriano, B. (2020). Biodegradación de plásticos en ambientes naturales. En *Zaragoza*. Universidad de Alcalá.

Stewars, K. (2020). Gram Positive vs Gram Negative. *Technology Networks*.

Suasnavas, D. (2017). Degradación de materiales plásticos "PET" (polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión. En *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*.

Sucasaire, J. (2021). *Coefficiente de variación*. <https://www.youtube.com/watch?v=XHDuKWJEUZI>

Taghavi, N. (2021). *Enhancement in biodegradation of thermoplastics using UV-pretreatment and biosurfactant* Navid Taghavi.

Tan, H., Wang, C., Zeng, G., Luo, Y., Li, H. y Xu, H. (2020). Bioreduction and biosorption of Cr(VI) by a novel *Bacillus* sp. CRB-B1 strain. *Journal of Hazardous Materials*, 386(August), 121628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121628>

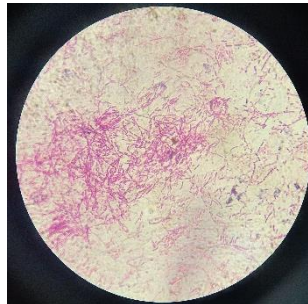
Torena, P., Alvarez-Cuenca, M. y Reza, M. (2021). Biodegradation of polyethylene terephthalate microplastics by bacterial communities from activated sludge. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(S1), S69–S82. <https://doi.org/10.1002/cjce.24015>

- Torres, S. y Avendaño, Y. (2019). *Evaluación de la diversidad bacteriana procedente de agua marina antártica utilizando microbiología convencional*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W. y Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7669–7678. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S. y Merino, F. (2013). Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos. *Rev. Perú. Biol.*, 17(1), 133–136.
- Valdivieso, S., Cedeño, G. y Guanoluisa, A. (2021). *Análisis Estadístico de los datos climáticos históricos de la ESPAM MFL*.
- Vásquez, W. (2020). Metodología de la investigación, Manual de estudiante. En *Universidad San Martín de Porres*.
- Vergara, K. (2018). *Efecto de la temperatura y concentración microbiana de Bacillus sp. en la degradación de grasas de agua residual de curtiembre Quimipiel S.A.C*. Universidad Nacional de Trujillo.
- Villafañe, I. (2018). *Análisis mecánico del material polimérico PET proveniente de botellas de plástico*. Universidad de Valladolid.
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F. y Villalobos, S. (2018). *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola*. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Widyananto, P. A., Muchlissin, S. I., Sabdon, A., Yulianto, B., Hamid, F. S. y Radjasa, O. K. (2021). Biodegradation of Polyethylene Microplastic using Culturable Coral-Associated Bacteria Isolated from Corals of Karimunjawa National Park. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 26(4), 237–247. <https://doi.org/10.14710/ik.ijms.26.4.237-246>

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Características macroscópicas y microscópicas.

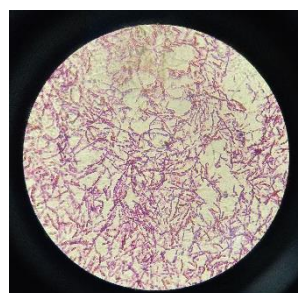
DEE - 71



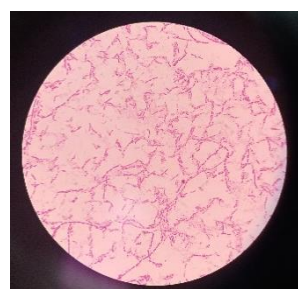
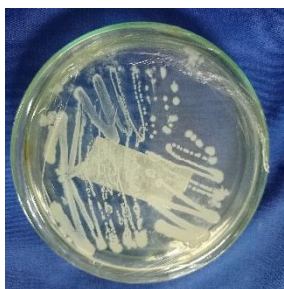
T-29



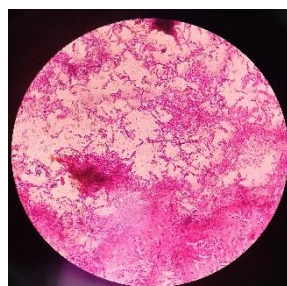
T-13



GA-52



T-21

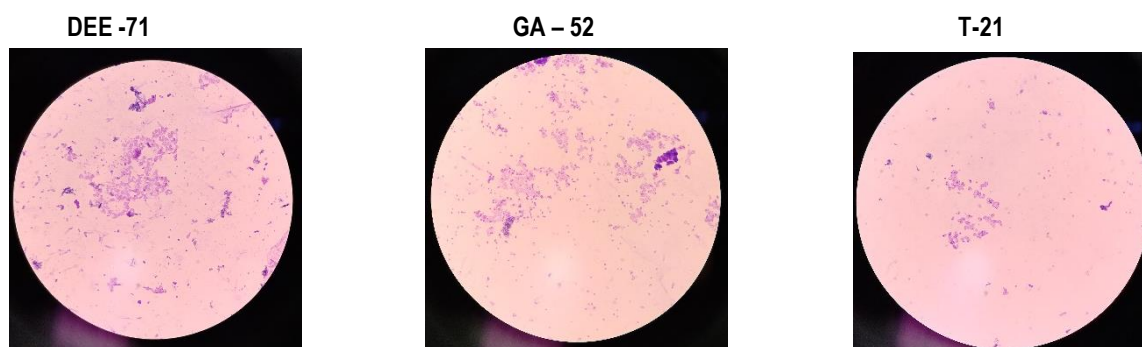


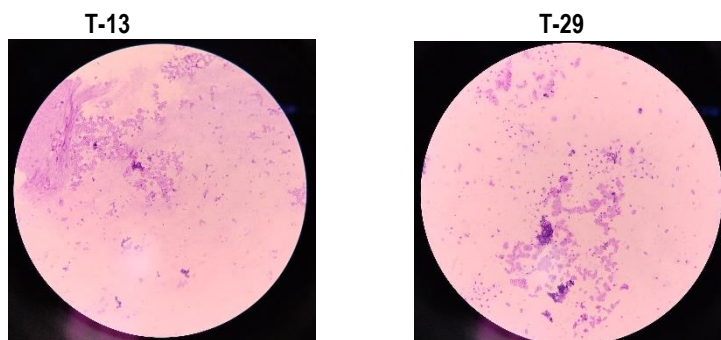
## Anexo 2. Registro del periodo de adaptación.

Periodo de adaptación		
Medio de cultivo	Fecha	Observación
Medio de sales minerales con Polvo PET	09/06/2022	Las bacterias inician el proceso de adaptación a 37°C y 150rpm
Medio de sales minerales con Polvo PET	13/06/2022	El medio presenta un cambio de coloración, de ser completamente transparente se torna a un color blanco translucido, indicativo de cambio en la turbidez del medio.
Medio de sales minerales con Polvo PET	20/06/2022	Se visualiza formación de biopelícula y aumento en la turbidez del medio. El polvo de PET se asienta en el fondo del matraz mientras está en reposo.
Medio de sales minerales con Polvo PET	23/06/2022	Se visualiza al microscopio el crecimiento de bacterias. Las 5 cepas se desarrollaron en el medio utilizado

Elaborado por: Las autoras.

## Anexo 3. Visualización microscópica de las cinco cepas de *Bacillus sp.* en el periodo de adaptación.





#### Anexo 4. Registro del periodo de biodegradación.

Periodo de biodegradación		
Medio de cultivo	fecha	Observación
Medio de sales minerales con Láminas PET	24/06/2022	Se inoculan las bacterias del proceso de adaptación en los 72 tubos de ensayo con MSM, a 170 rpm y a temperatura ambiente.
Medio de sales minerales con Láminas PET	01/07/2022	Presencia de sedimento de color blanco, turbidez muy baja.
Medio de sales minerales con Láminas PET	08/07/2022	Turbidez baja con formación de biopelícula en todas las réplicas. Retiro, lavado y pesaje de láminas.
Medio de sales minerales con Láminas PET	11/07/2022	Visualización de láminas bajo el microscopio.
Medio de sales minerales con Láminas PET	15/07/2022	Cambio en la turbidez, ligero aumento. Sedimento con coloración crema y formación grumosa. El plástico muestra adherencias
Medio de sales minerales con Láminas PET	22/07/2022	No hubo mayor variación. Se retiran las láminas y se pesan.
Medio de sales minerales con Láminas PET	25/07/2022	Visualización de láminas bajo el microscopio.
Medio de sales minerales con Láminas PET	29/07/2022	La turbidez y biopelícula se mantiene sin mayores cambios. Las adherencias de las láminas parece ser mayor en todas las réplicas a excepción del control
Medio de sales minerales con Láminas PET	05/08/2022	Retiro, lavado y peso de laminas
Medio de sales minerales con Láminas PET	08/08/2022	Visualización de láminas bajo el microscopio.

**Anexo 5. Registro de pérdida de peso de las láminas PET y su variación respecto a los diferentes periodos de tiempo evaluados (15, 30 y 45 días).**

Tratamientos	Muestras	PI (g)	PI (mg)	PF (g)	PF (mg)	PP (g)	PP (mg)	%PP (%)
DEE-71	M1	0,0370	37,0000	0,0370	37,0000	0,0000	0,0000	0,0000
T-29	M1	0,0443	44,3000	0,0441	44,1000	0,0002	0,2000	0,4515
T-13	M1	0,0398	39,8000	0,0398	39,8000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M1	0,0475	47,5000	0,0474	47,4000	0,0001	0,1000	0,2105
T-21	M1	0,0373	37,3000	0,0372	37,2000	0,0001	0,1000	0,2681
CONTROL	M1	0,0355	35,5000	0,0355	35,5000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M2	0,0295	29,5000	0,0295	29,5000	0,0000	0,0000	0,0000
T-29	M2	0,0338	33,8000	0,0338	33,8000	0,0000	0,0000	0,0000
T-13	M2	0,0306	30,6000	0,0306	30,6000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M2	0,0479	47,9000	0,0479	47,9000	0,0000	0,0000	0,0000
T-21	M2	0,0340	34,0000	0,0340	34,0000	0,0000	0,0000	0,0000
CONTROL	M2	0,0284	28,4000	0,0284	28,4000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M3	0,0395	39,5000	0,0395	39,5000	0,0000	0,0000	0,0000
T-29	M3	0,0408	40,8000	0,0408	40,8000	0,0000	0,0000	0,0000
T-13	M3	0,0368	36,8000	0,0368	36,8000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M3	0,0399	39,9000	0,0399	39,9000	0,0000	0,0000	0,0000
T-21	M3	0,0414	41,4000	0,0413	41,3000	0,0001	0,1000	0,2415
CONTROL	M3	0,0450	45,0000	0,0450	45,0000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M4	0,0384	38,4000	0,0383	38,3000	0,0001	0,1000	0,2604
T-29	M4	0,0330	33,0000	0,0330	33,0000	0,0000	0,0000	0,0000
T-13	M4	0,0404	40,4000	0,0402	40,2000	0,0002	0,2000	0,4950



GA-52	M4	0,0311	31,1000	0,0308	30,8000	0,0003	0,3000	0,9646
T-21	M4	0,0391	39,1000	0,0390	39,0000	0,0001	0,1000	0,2558
CONTROL	M4	0,0338	33,8000	0,0338	33,8000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M1	0,0292	29,2000	0,0287	28,7000	0,0005	0,5000	1,7123
T-29	M1	0,0336	33,6000	0,0329	32,9000	0,0007	0,7000	2,0833
T-13	M1	0,0477	47,7000	0,0477	47,7000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M1	0,0290	29,0000	0,0287	28,7000	0,0003	0,3000	1,0345
T-21	M1	0,0338	33,8000	0,0338	33,8000	0,0000	0,0000	0,0000
CONTROL	M1	0,0388	38,8000	0,0388	38,8000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M2	0,0392	39,2000	0,0392	39,2000	0,0000	0,0000	0,0000
T-29	M2	0,0326	32,6000	0,0326	32,6000	0,0000	0,0000	0,0000
T-13	M2	0,0385	38,5000	0,0383	38,3000	0,0002	0,2000	0,5195
GA-52	M2	0,0437	43,7000	0,0435	43,5000	0,0002	0,2000	0,4577
T-21	M2	0,0498	49,8000	0,0498	49,8000	0,0000	0,0000	0,0000
CONTROL	M2	0,0388	38,8000	0,0388	38,8000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M3	0,0330	33,0000	0,0330	33,0000	0,0000	0,0000	0,0000
T-29	M3	0,0384	38,4000	0,0384	38,4000	0,0000	0,0000	0,0000
T-13	M3	0,0401	40,1000	0,0401	40,1000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M3	0,0358	35,8000	0,0358	35,8000	0,0000	0,0000	0,0000
T-21	M3	0,0403	40,3000	0,0401	40,1000	0,0002	0,2000	0,4963
CONTROL	M3	0,0383	38,3000	0,0383	38,3000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M4	0,0399	39,9000	0,0395	39,5000	0,0004	0,4000	1,0025
T-29	M4	0,0361	36,1000	0,0359	35,9000	0,0002	0,2000	0,5540
T-13	M4	0,0401	40,1000	0,0401	40,1000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M4	0,0498	49,8000	0,0498	49,8000	0,0000	0,0000	0,0000
T-21	M4	0,0301	30,1000	0,0300	30,0000	0,0001	0,1000	0,3322
CONTROL	M4	0,0453	45,3000	0,0453	45,3000	0,0000	0,0000	0,0000

DEE-71	M1	0,0378	37,8000	0,0370	37,0000	0,0008	0,8000	2,1164
T-29	M1	0,0313	31,3000	0,0304	30,4000	0,0009	0,9000	2,8754
T-13	M1	0,0416	41,6000	0,0416	41,6000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M1	0,0381	38,1000	0,0379	37,9000	0,0002	0,2000	0,5249
T-21	M1	0,0367	36,7000	0,0367	36,7000	0,0000	0,0000	0,0000
CONTROL	M1	0,0382	38,2000	0,0382	38,2000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M2	0,0366	36,6000	0,0366	36,6000	0,0000	0,0000	0,0000
T-29	M2	0,0332	33,2000	0,0327	32,7000	0,0005	0,5000	1,5060
T-13	M2	0,0325	32,5000	0,0325	32,5000	0,0000	0,0000	0,0000
GA-52	M2	0,0290	29,0000	0,0289	28,9000	0,0001	0,1000	0,3448
T-21	M2	0,0307	30,7000	0,0304	30,4000	0,0003	0,3000	0,9772
CONTROL	M2	0,0351	35,1000	0,0351	35,1000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M3	0,0413	41,3000	0,0409	40,9000	0,0004	0,4000	0,9685
T-29	M3	0,0340	34,0000	0,0340	34,0000	0,0000	0,0000	0,0000
T-13	M3	0,0375	37,5000	0,0373	37,3000	0,0002	0,2000	0,5333
GA-52	M3	0,0331	33,1000	0,0331	33,1000	0,0000	0,0000	0,0000
T-21	M3	0,0521	52,1000	0,0521	52,1000	0,0000	0,0000	0,0000
CONTROL	M3	0,0376	37,6000	0,0376	37,6000	0,0000	0,0000	0,0000
DEE-71	M4	0,0370	37,0000	0,0366	36,6000	0,0004	0,4000	1,0811
T-29	M4	0,0349	34,9000	0,0346	34,6000	0,0003	0,3000	0,8596
T-13	M4	0,0405	40,5000	0,0404	40,4000	0,0001	0,1000	0,2469
GA-52	M4	0,0475	47,5000	0,0465	46,5000	0,0010	1,0000	2,1053
T-21	M4	0,0313	31,3000	0,0305	30,5000	0,0008	0,8000	2,5559
CONTROL	M4	0,0336	33,6000	0,0336	33,6000	0,0000	0,0000	0,0000
Media general		0,0376	37,6097	0,0375	37,4708	0,0001	0,1389	0,3894

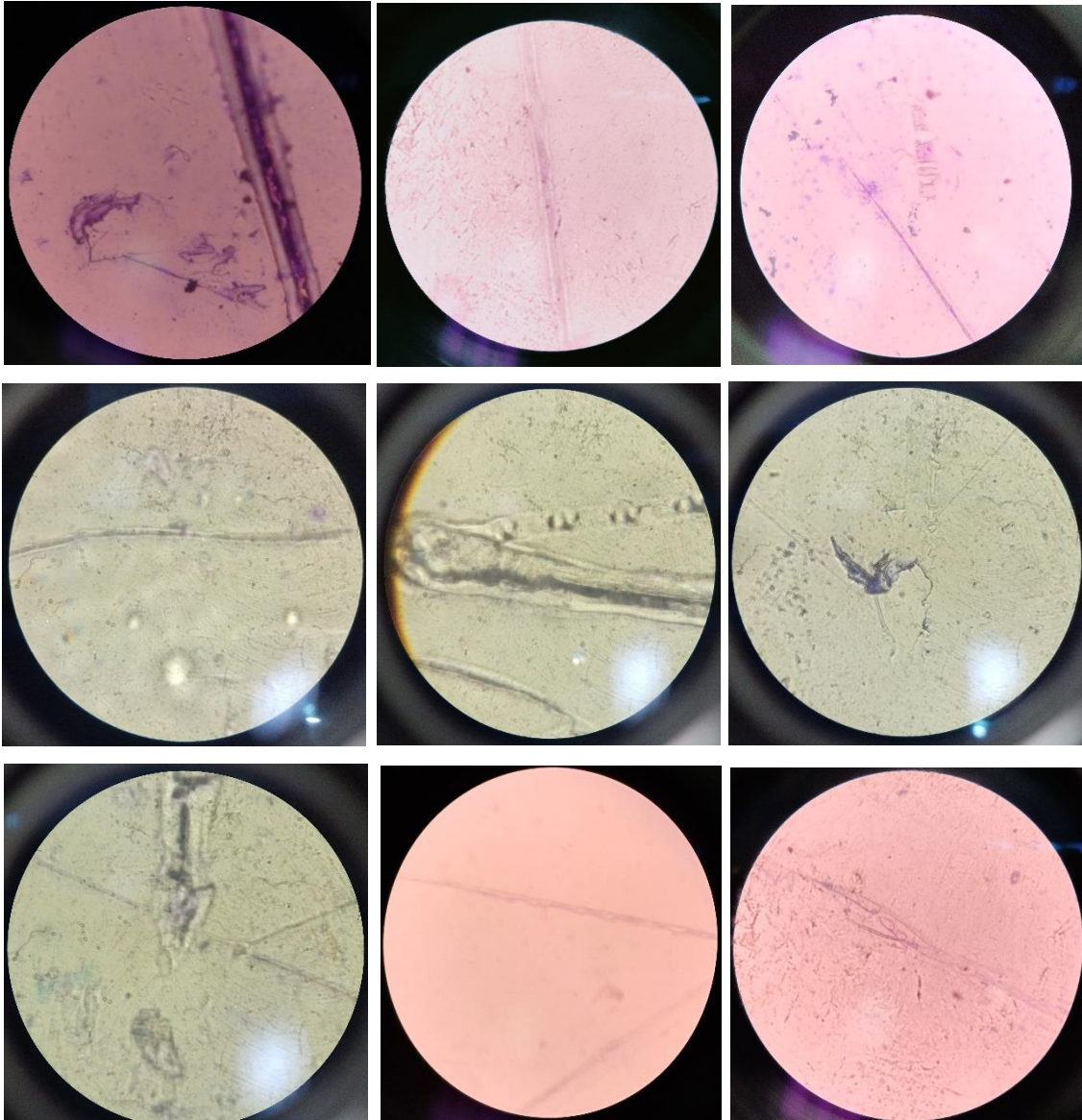
## Anexo 6. Porcentaje de Pérdida de Peso (%P<sub>P</sub>).

Tratamientos	Bloques											
	B1_15D				B2_30D				B3_45D			
	P <sub>I</sub> (mg)	P <sub>F</sub> (mg)	P <sub>P</sub> (mg)	%P <sub>P</sub> (%)	P <sub>I</sub> (mg)	P <sub>F</sub> (mg)	P <sub>P</sub> (mg)	%P <sub>P</sub> (%)	P <sub>I</sub> (mg)	P <sub>F</sub> (mg)	P <sub>P</sub> (mg)	%P <sub>P</sub> (%)
<b>DEE-71</b>	36,1000	36,0750	<b>0,0250</b>	<b>0,0651</b>	35,3250	35,1000	<b>0,2250</b>	<b>0,6787</b>	38,1750	37,7750	<b>0,4000</b>	<b>1,0415</b>
<b>T-29</b>	37,9750	37,9250	<b>0,0500</b>	<b>0,1129</b>	35,1750	34,9500	<b>0,2250</b>	<b>0,6593</b>	33,3500	32,9250	<b>0,4250</b>	<b>1,3103</b>
<b>T-13</b>	36,9000	36,8500	<b>0,0500</b>	<b>0,1238</b>	41,6000	41,5500	<b>0,0500</b>	<b>0,1299</b>	38,0250	37,9500	<b>0,0750</b>	<b>0,1951</b>
<b>GA-52</b>	41,6000	41,5000	<b>0,1000</b>	<b>0,2938</b>	39,5750	39,4500	<b>0,1250</b>	<b>0,3730</b>	36,9250	36,6000	<b>0,3250</b>	<b>0,7438</b>
<b>T-21</b>	37,9500	37,8750	<b>0,0750</b>	<b>0,1913</b>	38,5000	38,4250	<b>0,0750</b>	<b>0,2071</b>	37,7000	37,4250	<b>0,2750</b>	<b>0,8833</b>
<b>CONTROL</b>	35,6750	35,6750	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	40,3000	40,3000	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	36,1250	36,1250	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
<b>Medias</b>	<b>Media (B1_15D)</b>			<b>0,1311</b>	<b>Media (B2_30D)</b>			<b>0,3413</b>	<b>Media (B3_45D)</b>			<b>0,6956</b>

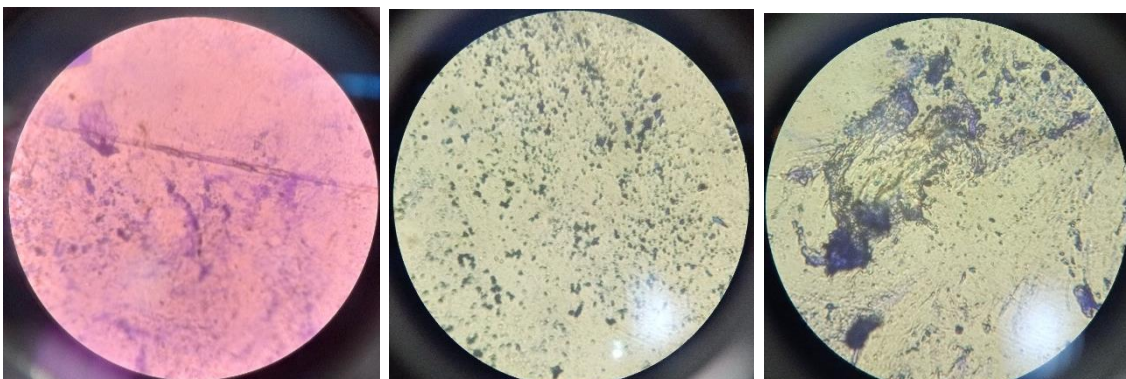
**B1\_15D** : Bloque 1 a los 15 días ; **B2\_30D** : Bloque 2 a los 30 días ; **B3\_45D** : Bloque 3 a los 45 días ; **P<sub>I</sub>** : Peso inicial ; **P<sub>F</sub>** : Peso final ; **P<sub>P</sub>** : Pérdida de peso ; **%P<sub>P</sub>** : Porcentaje de pérdida de peso.

Elaborado por: las autoras.

**Anexo 7. Observación al microscopio óptico de las láminas de PET (100X).**



**Anexo 8. Visualización de biopelícula adherida a las láminas de PET.**



### Anexo 9. Porcentaje de Pérdida de Peso (%P<sub>P</sub>) y su transformación (%P<sub>P\_TRANS</sub>).

Tratamientos	Bloques														
	B1_15D					B2_30D					B3_45D				
	P <sub>I</sub> (mg)	P <sub>F</sub> (mg)	P <sub>P</sub> (mg)	%P <sub>P</sub> (%)	%P <sub>P_TRANS</sub> (%)	P <sub>I</sub> (mg)	P <sub>F</sub> (mg)	P <sub>P</sub> (mg)	%P <sub>P</sub> (%)	%P <sub>P_TRANS</sub> (%)	P <sub>I</sub> (mg)	P <sub>F</sub> (mg)	P <sub>P</sub> (mg)	%P <sub>P</sub> (%)	%P <sub>P_TRANS</sub> (%)
DEE-71	36,1000	36,0750	0,0250	0,0651	1,0320	35,3250	35,1000	0,2250	0,6787	1,2956	38,1750	37,7750	0,4000	1,0415	1,4288
T-29	37,9750	37,9250	0,0500	0,1129	1,0549	35,1750	34,9500	0,2250	0,6593	1,2882	33,3500	32,9250	0,4250	1,3103	1,5200
T-13	36,9000	36,8500	0,0500	0,1238	1,0601	41,6000	41,5500	0,0500	0,1299	1,0630	38,0250	37,9500	0,0750	0,1951	1,0932
GA-52	41,6000	41,5000	0,1000	0,2938	1,1374	39,5750	39,4500	0,1250	0,3730	1,1718	36,9250	36,6000	0,3250	0,7438	1,3205
T-21	37,9500	37,8750	0,0750	0,1913	1,0915	38,5000	38,4250	0,0750	0,2071	1,0987	37,7000	37,4250	0,2750	0,8833	1,3723
CONTROL	35,6750	35,6750	0,0000	0,0000	1,0000	40,3000	40,3000	0,0000	0,0000	1,0000	36,1250	36,1250	0,0000	0,0000	1,0000
Medias	Media (B1_15D)		0,1311	1,0627		Media (B2_30D)		0,3413	1,1529		Media (B3_45D)		0,6956	1,2891	

B1\_15D : Bloque 1 a los 15 días ; B2\_30D : Bloque 2 a los 30 días ; B3\_45D : Bloque 3 a los 45 días ; P<sub>I</sub> : Peso inicial ; P<sub>F</sub> : Peso final ; P<sub>P</sub> : Pérdida de peso ; %P<sub>P</sub> : Porcentaje de pérdida de peso ; %P<sub>P\_TRANS</sub> : Porcentaje de pérdida de peso transformado.

## Anexo 10. Análisis de varianza y test de Tukey en el porcentaje de Pérdida de Peso Transformado (%P<sub>P\_TRANS</sub>).

### Análisis de la varianza

#### %PP\_TRANS

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
%PP TRANS	18	0,76	0,60	8,75

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,34	7	0,05	4,63	0,0149
Tratamientos	0,18	5	0,04	3,50	0,0436
Bloques	0,16	2	0,08	7,46	0,0104
Error	0,10	10	0,01		
Total	0,44	17			

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29002

Error: 0,0105 gl: 10

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T-29	1,29	3	0,06	A
DEE-71	1,25	3	0,06	A
GA-52	1,21	3	0,06	A
T-21	1,19	3	0,06	A
T-13	1,07	3	0,06	A
CONTROL	1,00	3	0,06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16185

Error: 0,0105 gl: 10

Bloques	Medias	n	E.E.	
B3_45D	1,29	6	0,04	A
B2_30D	1,15	6	0,04	A B
B1_15D	1,06	6	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

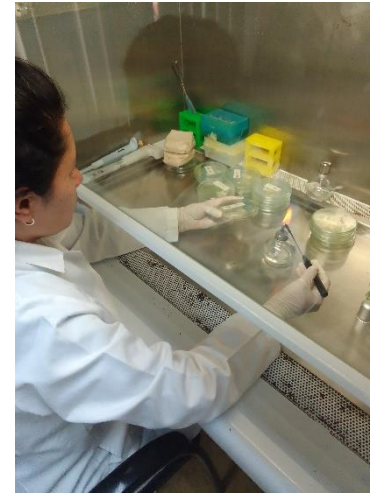
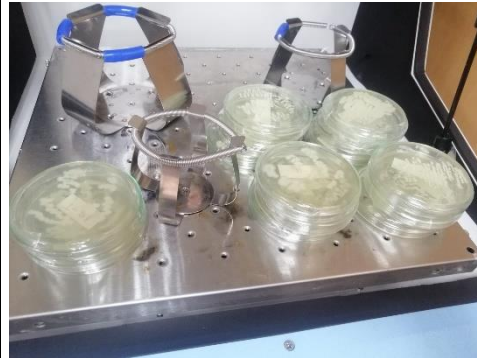
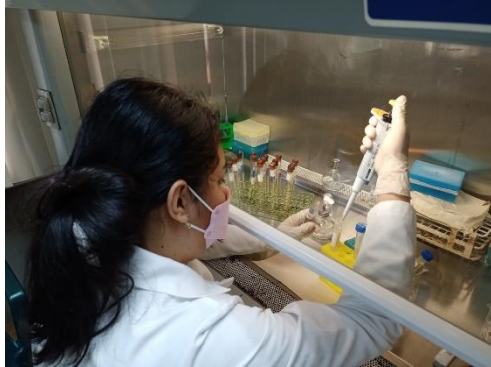
## Anexo 11. Procedimiento.

### FASE I. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS *Bacillus sp.* PRESENTES EN MUESTRAS DE SUELO DE LA ANTÁRTIDA

#### ACTIVIDAD 1. REACTIVACIÓN DE BACTERIAS Y TINCIÓN DE GRAM







**FASE II. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE *Bacillus* sp. EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET**  
**ACTIVIDAD 2. SELECCIÓN DE MUESTRAS DE PET**



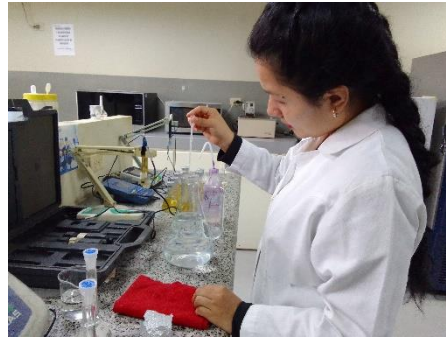
**ACTIVIDAD 3. PREPARACIÓN DEL PET**



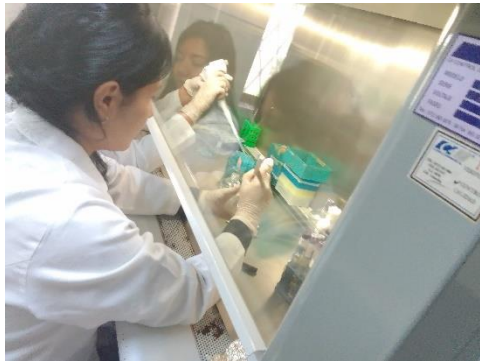


#### ACTIVIDAD 4. ELABORACIÓN DEL MEDIO DE SALES MINERALES





**ACTIVIDAD 5. ADAPTACIÓN DE *Bacillus* sp. EN MEDIO ENRIQUECIDO CON PET**





**ACTIVIDAD 6. BIODEGRADACIÓN DE PET POR *Bacillus* sp.****FASE III. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN DEL PET EN RELACIÓN A LA PÉRDIDA DE PESO Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS MEJORES RESULTADOS ENCONTRADOS****ACTIVIDAD 7. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN POR PÉRDIDA DE PESO**